

⑯ BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENT- UND  
MARKENAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**  
⑩ **DE 100 45 521 A 1**

⑤① Int. Cl.<sup>7</sup>:  
**C 12 Q 1/68**

⑦① Aktenzeichen: 100 45 521.2  
⑦② Anmeldetag: 13. 9. 2000  
⑦③ Offenlegungstag: 4. 10. 2001

DE 100 45 521 A 1

⑦④ Unionspriorität:  
00 10 7036. 6 31. 03. 2000 EP  
⑦⑤ Innere Priorität:  
100 34 209. 4 13. 07. 2000  
⑦⑥ Anmelder:  
Roche Diagnostics GmbH, 68305 Mannheim, DE

⑦⑦ Erfinder:  
Sagner, Gregor, 82377 Penzberg, DE; Tabiti, Karim,  
82343 Pöcking, DE; Gutekunst, Martin, 82390  
Eberfing, DE; Soong, Richie, 82327 Tutzing, DE

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

- ⑦⑧ Nukleinsäureamplifikationen  
⑦⑨ Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zur Bestimmung der Effizienz der Amplifikation einer Target-Nukleinsäure, umfassend die folgenden Schritte: (i) Erstellung einer Verdünnungsreihe der Target-Nukleinsäure, (ii) Amplifikation der Target-Nukleinsäure unter definierten Reaktionsbedingungen, wobei die Amplifikation der Nukleinsäure in Echtzeit gemessen wird, (iii) Festsetzung eines definierten Signalschwellenwertes, (iv) Bestimmung der Zykluszahl, bei der der Signalschwellenwert überschritten wird, für verschiedene Verdünnungen, (v) Bestimmung der Amplifikationseffizienz in Abhängigkeit von der ursprünglichen Menge an Target-Nukleinsäure, Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist auch ein Verfahren zur Quantifizierung einer Target-Nukleinsäure in einer Probe, bei der die Effizienz der Amplifikationsreaktion auf diese Weise bestimmt und bei der Quantifizierung berücksichtigt wird.

DE 100 45 521 A 1



## Beschreibung

[0001] Die vorliegende Erfindung stammt aus dem Gebiet der Quantifizierung von Nukleinsäuren mit Hilfe von quantitativer Echtzeit PCR.

## Stand der Technik

[0002] Verfahren zur Quantifizierung von Nukleinsäuren sind auf verschiedenen Gebieten der Molekularbiologie und insbesondere für die molekulare Diagnostik von Bedeutung. Auf DNA-Ebene werden derartige Verfahren beispielsweise zur Bestimmung von Kopienzahlen von im Genom amplifizierten Gensequenzen eingesetzt. Insbesondere finden Verfahren zur Quantifizierung von Nukleinsäuren jedoch im Zusammenhang mit der Bestimmung von mRNA-Mengen Verwendung, weil diese in der Regel ein Maß für die Expression des jeweiligen codierenden Gens darstellen.

[0003] Bei in hinreichender Menge zur Verfügung stehendem Probenmaterial kann eine Quantifizierung spezieller mRNAs mit konventionellen Verfahren, wie Northern-Blot-Analyse- oder RNase-Protection-Assay-Verfahren durchgeführt werden. Diese Methoden sind jedoch bei nur in geringer Menge zur Verfügung stehendem Probenmaterial oder sehr schwach exprimierten Genen nicht sensitiv genug.

[0004] Eine wesentliche sensitivere Methode stellt allerdings die sogenannte RT-PCR dar. Bei diesem Verfahren wird ausgehend von der zu analysierenden mRNA zunächst eine einzelsträngige c-DNA mit Hilfe einer Reversen Transkriptase hergestellt. Anschließend wird mit Hilfe von PCR ein doppelsträngiges DNA-Amplifikationsprodukt erzeugt.

[0005] Dabei sind zwei verschiedene Varianten zu unterscheiden:

- Bei der sogenannten relativen Quantifizierung wird das Verhältnis der Expression einer bestimmten Target-RNA relativ zu der Menge an RNA eines sogenannten Housekeeping-Gens bestimmt, von dem angenommen wird, dass es in allen Zellen unabhängig vom jeweiligen physiologischen Status konstitutiv exprimiert wird. Somit liegt die mRNA in allen Zellen in ungefähr gleicher Menge vor.

- Dies hat den Vorteil, dass unterschiedliche Ausgangsqualitäten verschiedener Probenmaterialien und der Prozess der RNA-Präparation keinen Einfluss auf das bestimmte Ergebnis hat. Eine absolute Quantifizierung ist mit dieser Methode jedoch nicht möglich.

- Alternativ dazu kann die absolute Menge an eingesetzter RNA mit Hilfe von Standardnukleinsäuren bekannter Kopienzahl und Amplifikation einer entsprechenden Verdünnungsreihe dieser Standardnukleinsäure bestimmt werden. Dabei sind zwei Alternativen möglich:

[0006] Bei der Verwendung von externen Standards erfolgt die Amplifikation von Standard- und Target-Nukleinsäure in getrennten Reaktionsgefäßen. Dabei kann ein Standard mit identischer Sequenz, wie die Target-Nukleinsäure verwendet werden. Bei dieser Art der Quantifizierung können jedoch systematische Fehler auftreten, falls die zu analysierende RNA-Präparation inhibitorische Komponenten enthält, die die Effizienz der sich anschließenden PCR-Reaktion beeinträchtigen. Derartige Fehler können durch die Verwendung von internen Standards, d. h. Amplifikation von Standard- und Target-Nukleinsäure in einem Reaktionsgefäß ausgeschlossen werden. Der Nachteil dieser Methode besteht jedoch darin, dass Standards verwendet werden müssen, die im Vergleich zur analysierten Target-Nukleinsäure unterschiedliche Sequenzen besitzen, um die Amplifikation von Standard- und Target-Nukleinsäure voneinander unterscheiden zu können. Dies kann wiederum zu einem systematischen Fehler bei der Quantifizierung führen, da bei unterschiedlichen Sequenzen unterschiedliche Effizienzen der PCR-Amplifikation nicht ausgeschlossen werden können.

[0007] Eine Quantifizierung von PCR-Produkten kann auf zwei prinzipiell unterschiedliche Arten erfolgen:

a) Endpunkt-Bestimmung der Menge an entstandenem PCR-Produkt in der Plateau-Phase der Amplifikationsreaktion.

Dabei korreliert die Menge an gebildetem PCR-Produkt nicht mit der Menge an initiiell eingesetzter Kopienzahl, weil die Amplifikation der Nukleinsäuren am Ende der Reaktion nicht mehr exponentiell erfolgt, sondern eine Sättigung erreicht. Demzufolge zeigen verschiedene initiale Kopienzahlen identische Mengen an entstandenem PCR-Produkt. Deshalb wird bei diesem Verfahren in der Regel die Methode der kompetitiven PCR bzw. der kompetitiven RT-PCR verwendet. Hierbei wird die spezifische Zielsequenz zusammen mit einer Verdünnungsreihe eines internen Standards bekannter Kopienzahl co-amplifiziert. Aus der Mischung mit identischer PCR-Produktmenge von Standard und Zielsequenz wird die initiale Kopienzahl der Zielsequenz extrapoliert. (Zimmermann et Mannhalter, Bio-Techniques 21: 280-279, 1996). Nachteil dieser Methode ist auch hier die Messung im Sättigungsbereich der Amplifikationsreaktion.

b) Kinetische Echt-Zeit Quantifizierung in der exponentiellen Phase der PCR.

Hierbei wird in jedem Zyklus der PCR die Entstehung von PCR-Produkten verfolgt. Die Messung der Amplifikation erfolgt dabei in der Regel in Thermozyklern, welche zusätzlich Mittel zur Messung von Fluoreszenzsignalen während der Amplifikationsreaktion aufweisen. Ein typisches Beispiel hierfür ist der Roche Diagnostics LightCycler (Cat. No. 2 011468). Die Amplifikationsprodukte werden beispielsweise durch Fluoreszenz-markierte Hybridisationsproben, die lediglich bei Bindung an die Target-Nukleinsäure Fluoreszenzsignale emittieren oder in bestimmten Fällen auch durch Doppelstrang-DNA bindende Fluoreszenzfarbstoffe detektiert. Ein definierter Schwellenwert wird für alle analysierten Reaktionen festgelegt und die zur Erreichung des Schwellenwerts notwendige Zykluszahl  $C_p$  sowohl für die Targetnukleinsäure als auch für die Referenznukleinsäuren wie Standard- bzw. Housekeeping-Gen bestimmt. Auf der Grundlage der für die Target-Nukleinsäure sowie die Referenz-Nukleinsäure erhaltenen  $C_p$ -Werte können auf diese Weise entweder absolute oder relative Kopienzahlen des Targetmoleküls bestimmt werden (Gibson et al., Genome Research 6: 995-1001, 1996; Bieche et al., Cancer Research 59: 2759-2765, 1999; WO 97/46707; WO 97/46712; WO 97/46714). Derartige Verfahren werden auch als Real Time



PCR bezeichnet.

[0008] Zusammengefasst erfolgt bei allen beschriebenen Verfahren die Quantifizierung einer Nukleinsäure über PCR immer mittels des Bezugs der während der Amplifikationsreaktion entstandenen Kopienzahl auf die entstandene Kopienzahl einer Referenznukleinsäure, bei der es sich entweder um einen Standard oder um die RNA eines Housekeeping-Gens handelt. Dabei wird angenommen, dass sich die PCR-Effizienz von Ziel- und Referenznukleinsäure nicht unterscheiden.

[0009] Im Allgemeinen wird eine PCR-Effizienz von 2,00 angenommen, die einer Verdoppelung der Kopienzahl pro PCR-Zyklus entspricht (User Bulletin No. 2 ABI Prism 7700, PE Applied Biosystems, 1997).

[0010] Es hat sich jedoch herausgestellt, dass eine reale PCR-Effizienz aber verschieden von 2,00 sein kann, da sie von verschiedenen Faktoren wie beispielsweise Bindung der Primer, Länge des PCR-Produktes, G/C-Gehalt und Sekundärstrukturen der zu amplifizierenden Nukleinsäure sowie von aufgrund der Probenvorbereitung im Reaktionsgemisch möglicherweise enthaltenen Inhibitoren beeinflusst wird. Dies betrifft insbesondere auch zu bei der Verwendung von heterologen Referenznukleinsäuren, wie z. B. bei der relativen Quantifizierung im Vergleich zur Expression von Housekeeping-Genen. Darüber hinaus ist auch nicht bekannt, ob und inwieweit die Ausgangskonzentration der nachzuweisenden Target-Nukleinsäure die Effizienz einer Amplifikationsreaktion signifikant beeinflusst.

[0011] Aufgabe der vorliegenden Erfindung war deshalb die Bereitstellung einer Methode zu einer möglichst exakten Bestimmung der Effizienz von Nukleinsäure-Amplifikationen sowie deren Einsatz im Rahmen von Methoden zur möglichst exakten Quantifizierung von Nukleinsäuren.

#### Kurzbeschreibung der Erfindung

[0012] Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß gelöst durch ein Verfahren zur Bestimmung der Effizienz der Amplifikation einer Target-Nukleinsäure, wobei

- a) eine Verdünnungsreihe der Target-Nukleinsäure hergestellt wird
- b) eine Amplifikation der Target-Nukleinsäure unter definierten Reaktionsbedingungen durchgeführt wird, wobei die Amplifikation der Nukleinsäure in Echtzeit gemessen wird
- c) ein definierter Signalschwellenwert festgesetzt wird
- d) für jede Verdünnung die Zykluszahl bestimmt wird, bei der der Signalschwellenwert überschritten wird,
- e) die Amplifikationseffizienz in Abhängigkeit von der ursprünglichen Menge an Target-Nukleinsäure bestimmt wird.

[0013] So kann die Bestimmung der Amplifikationseffizienz dadurch erfolgen, dass eine nicht lineare stetig differenzierbare Funktion eines Logarithmus der für die Amplifikation eingesetzten Kopienzahl an Target Nukleinsäure in Abhängigkeit von der Zykluszahl, bei der der Signalschwellenwert überschritten wird, erstellt wird, und aus der ermittelten Funktion die Amplifikationseffizienz E in Abhängigkeit von der Menge an Target-Nukleinsäure berechnet wird. Vorzugsweise wird bei dieser Ausführungsform die Amplifikationseffizienz E einer bestimmten Menge an Target-Nukleinsäure als die negative lokale 1. Ableitung der stetig differenzierbaren Funktion aus Schritt e) ermittelt.

[0014] Alternativ kann die Effizienz der Amplifikation auch dadurch bestimmt werden, dass eine nicht lineare stetig differenzierbare Funktion der ermittelten Zykluszahlen in Abhängigkeit vom Logarithmus der für die Amplifikation eingesetzten Kopienzahlen an Target Nukleinsäure erstellt wird und aus der ermittelten Funktion die Amplifikationseffizienz E berechnet wird. Vorzugsweise wird in diesem Falle die Amplifikationseffizienz E einer bestimmten Menge an Target-Nukleinsäure als die reziproke negative lokale 1. Ableitung der stetig differenzierbaren Funktion aus Schritt e) ermittelt.

[0015] Als besonders vorteilhaft haben sich Verfahren herausgestellt, bei denen die Amplifikationseffizienz in Abhängigkeit vom Logarithmus der Konzentration der Target-Nukleinsäure oder umgekehrt mithilfe eines polynomischen Fits zur Ermittlung der nichtlinearen stetig differenzierbaren Funktion ermittelt wird. Dabei kann es sich um einen polynomischen Fit 3., 4., 5., 6., oder 7. Ordnung und bevorzugt um einen Fit 4. Ordnung handeln.

[0016] Erfindungsgemäße Verfahren zur Quantifizierung einer Target-Nukleinsäure in einer Probe umfassen demzufolge die folgenden Schritte:

- a) Erfindungsgemäße Bestimmung der Amplifikationseffizienz der Target-Nukleinsäure unter definierten Bedingungen.
- b) Amplifikation der in der Probe enthaltenen Target-Nukleinsäure unter den gleichen Reaktionsbedingungen.
- c) Messung der Amplifikation in Echtzeit
- d) Quantifizierung der ursprünglichen Menge der Target-Nukleinsäure in der Probe durch Korrektur der aus Schritt c) abgeleiteten ursprünglichen Menge mit Hilfe der bestimmten Amplifikationseffizienz.

[0017] Diese Verfahren sind sowohl für relative Quantifizierung im Vergleich zur Expression von Housekeeping Genen als auch für absolute Quantifizierung einsetzbar.

[0018] Verfahren zur absoluten Quantifizierung einer Target-Nukleinsäure in einer Probe, umfassen erfindungsgemäß die folgenden Schritte:

- a) Erfindungsgemäße Bestimmung der Amplifikationseffizienzen der Target-Nukleinsäure sowie eines internen oder externen Standards unter definierten Amplifikationsbedingungen
- b) Amplifikation der in der Probe enthaltenen Target-Nukleinsäure sowie des internen oder externen Standards unter den gleichen definierten Reaktionsbedingungen
- c) Messung der Amplifikation von Target-Nukleinsäure und Standard in Echtzeit



d) Berechnung der ursprünglichen Kopienzahl in der Probe durch Korrektur der aus Schritt c) abgeleiteten Kopienzahl mit Hilfe der in Schritt a) bestimmten Amplifikationseffizienzen

[0019] Verfahren zur Quantifizierung einer Target-Nukleinsäure in einer Probe relativ zu einer Referenz-Nukleinsäure, umfassen dagegen die folgenden Schritte:

- a) Erfindungsgemäße Bestimmung der Amplifikationseffizienzen der Target-Nukleinsäure und der Referenz-Nukleinsäure unter definierten Amplifikationsbedingungen
- b) Amplifikation sowohl der in der Probe enthaltenen Target-Nukleinsäure als auch der in der Probe enthaltenen Referenz-Nukleinsäure unter den gleichen definierten Amplifikationsbedingungen
- c) Messung der Amplifikation der Target-Nukleinsäure und der Referenz-Nukleinsäure in Echtzeit
- d) Berechnung des ursprünglichen Verhältnisses von Target-Nukleinsäure und Referenz-Nukleinsäure in der Probe durch Korrektur des aus Schritt c) abgeleiteten Verhältnisses mit Hilfe der in Schritt a) bestimmten Amplifikationseffizienzen

[0020] Gegenstand der Erfindung sind darüber hinaus sämtliche Verfahren, bei denen eine Bestimmung und insbesondere eine von der Ausgangskonzentration abhängige Bestimmung der Amplifikationseffizienzen nur indirekt in das Quantifizierungsergebnis eingeht. Bestandteil der Erfindung ist in diesem Sinne insbesondere ein Verfahren zur relativen Quantifizierung einer Target-Nukleinsäure im Verhältnis zu einer Referenznukleinsäure und normiert auf eine Kalibratorprobe, umfassend die folgenden Schritte:

- a) Herstellung einer gemeinsamen oder zwei getrennter Verdünnungsreihen von Target-Nukleinsäure und Referenz-Nukleinsäure.
- b) Amplifikation der verschiedenen Verdünnungen von Target-Nukleinsäure und Referenz-Nukleinsäure unter definierten Reaktionsbedingungen, wobei die Amplifikation der Nukleinsäure in Echtzeit gemessen wird.
- c) Festsetzung von definierten Signalschwellenwerten für Target-Nukleinsäure und Referenz-Nukleinsäure.
- d) Bestimmung der Zykluszahlen  $C_p$ , bei denen die für Target-Nukleinsäure und Referenz-Nukleinsäure definierten Signalschwellenwerte in jeder Verdünnung überschritten werden.
- e) Erstellung einer stetig differenzierbaren Funktion des Logarithmus der eingesetzten Mengen an Target-Nukleinsäure in Abhängigkeit von den in d) bestimmten  $C_p$ -Werten sowie Erstellung einer stetig differenzierbaren Funktion des Logarithmus der eingesetzten Mengen an Referenz-Nukleinsäure in Abhängigkeit von den bestimmten  $C_p$ -Werten.
- f) Bestimmung der  $C_p$ -Werte für Target-Nukleinsäure und Referenz-Nukleinsäure sowohl in der zu analysierenden Probe als auch in einer Kalibratorprobe.
- g) Zuordnung der in Schritt f) gemessenen  $C_p$ -Werte zu bestimmten Funktionswerten der in Schritt e) ermittelten Funktionen.
- h) Bildung der Quotienten der Funktionswerte aus g) von Target-Nukleinsäure und Referenz-Nukleinsäure sowohl für die zu analysierende Probe als auch für die Kalibratorprobe.
- i) Bestimmung des Verhältnisses der Quotienten aus h) als Maß für die ursprünglich in der Probe enthaltenen Menge an Target-DNA.

#### Detaillierte Beschreibung der Erfindung

##### A) Erfordernis einer Target-abhängigen Effizienzkorrektur

[0021] Die Bedeutung einer Effizienzkorrektur bei quantitativen Nukleinsäureamplifikationsverfahren wird durch eine Fehlerberechnung deutlich. In Tabelle 1 ist die theoretische Berechnung des durchschnittlichen prozentualen Fehlers der ermittelten Kopienzahl bei von 2,00 verschiedenen Amplifikationseffizienzen in Abhängigkeit von der jeweiligen Zykluszahl dargestellt. Die Fehlerberechnung erfolgte nach der Formel

$$\text{Prozentualer Fehler} = (2^n/E^n - 1) \times 100$$

wobei E die Effizienz der Amplifikation ist und n die jeweilige Zykluszahl ist, bei der der prozentuale Fehler bestimmt wird.



Tabelle 1

Detektion Zyklus (n) PCR Effizienz (E)	10	15	20	25	30	35
2.00	-	-	-	-	-	-
1.97	16%	25%	35%	46%	57%	70%
1.95	29%	46%	66%	88%	113%	142%
1.90	67%	116%	179%	260%	365%	500%
1.80	187%	385%	722%	1290%	2260%	3900%
1.70	408%	1045%	2480%	5710%	13.000%	29.500%
1.60	920%	2740%	8570%	26.400%	80.700%	246.400%

[0022] Die Bestimmung der Amplifikationseffizienz einer PCR Reaktion kann durch verschiedene Verfahren bestimmt werden. 15

[0023] Beispielsweise kann dies im Real Time Monitoring von PCR Reaktionen dadurch erfolgen, dass in jedem Amplifikationszyklus die Menge an amplifizierten Target-Nukleinsäure bestimmt wird und aus den erhaltenen Werten die Effizienz der Amplifikationsreaktion bestimmt wird.

[0024] Alternativ kann die Effizienz der Amplifikationsreaktion eines bestimmten Targets im Real Time PCR-Modus unter definierten Bedingungen dadurch ermittelt werden, dass zunächst verschiedene Verdünnungen der Target-Nukleinsäure amplifiziert werden und für jede Verdünnung eine Zykluszahl ermittelt wird, bei der ein zuvor festgestellter Signalschwellenwert überschritten wird. 20

[0025] Die Effizienz wird dann aus der Steigung einer Funktion des Logarithmus der eingesetzten Kopienzahl in Abhängigkeit von der für die jeweiligen Kopienzahl ermittelten Zykluszahl ermittelt. Dieses Verfahren hat den Vorteil, dass kein systematischer Fehler dadurch auftreten kann, dass die Bestimmung der Amplifikationseffizienz in einer Phase der PCR-Reaktion erfolgt, bei der keine exponentielle Vermehrung der Target-Nukleinsäure mehr stattfindet (Plateau-Phase). 25

[0026] Allerdings hat sich unerwartet herausgestellt, dass unter bestimmten Umständen die Amplifikationseffizienz auch von der ursprünglichen Menge an Target-Nukleinsäure abhängig sein kann. Insbesondere bei niedrigeren Konzentrationen kann bei entsprechenden experimentellen Ansätzen eine offensichtlich veränderte Amplifikationseffizienz festgestellt werden. Demzufolge ergeben sich bei den oben beschriebenen Verfahren zur Ermittlung der Effizienz nicht lineare Funktionen, so dass in diesen Fällen die beschriebene Ermittlung der Steigung einer Regressionsgerade insbesondere bei geringen Konzentrationen an Target-Nukleinsäure zum Beispiel zu niedrige Werte bezüglich der zu ermittelnden Amplifikationseffizienzen ergibt. 30

[0027] Aufgrund der Abhängigkeit der Amplifikationseffizienz von der Konzentration der Target-Nukleinsäure kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Amplifikationseffizienz sich auch bereits während der ersten Zyklen einer Amplifikationsreaktion verändert, obwohl sich diese noch in einer exponentiellen Phase befindet. Da dieses Phänomen aber experimentell aufgrund mangelnder Detektionssensitivität während der ersten Zyklen nicht direkt analysierbar ist, wird im Folgenden unter einer Konzentrations-abhängigen Amplifikationseffizienz die zum jeweiligen Detektionszeitpunkt über die erfolgten Zyklen gemittelte Amplifikationseffizienz verstanden. 35 40

#### B) Absolute und relative Quantifizierung

[0028] Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind deshalb Verfahren zur Effizienz-korrigierten Quantifizierung von Nukleinsäuren, bei denen die Effizienz der Amplifikation dadurch bestimmt wird, dass 45

- eine Verdünnungsreihe der Target-Nukleinsäure hergestellt wird
- eine Amplifikation der Target-Nukleinsäure unter definierten Reaktionsbedingungen gemäß Anspruch 1 durchgeführt wird, wobei die Amplifikation der Nukleinsäure in Echtzeit gemessen wird
- ein definierter Signalschwellenwert festgesetzt wird
- für jede Verdünnung die Zykluszahl  $C_p$  bestimmt wird, bei der der Signalschwellenwert überschritten wird, und
- die Amplifikationseffizienz in Abhängigkeit von der Menge an Target-Nukleinsäure bestimmt wird. 50

[0029] Insbesondere kann die Amplifikationseffizienz in Abhängigkeit von der ursprünglichen Menge an Target-Nukleinsäure dadurch bestimmt werden, dass 55

- eine nicht lineare stetig differenzierbare Funktion eines Logarithmus der für die Amplifikation eingesetzten Kopienzahl an Target-Nukleinsäure in Abhängigkeit von der Zykluszahl, bei der der Signalschwellenwert überschritten wird, erstellt wird, oder alternativ eine nicht lineare stetig differenzierbare Funktion der ermittelten Zykluszahl in Abhängigkeit von einem Logarithmus der jeweils eingesetzten Kopienzahl an Target-Nukleinsäure erstellt wird, und
- aus der ermittelten Funktion die Amplifikationseffizienz  $E$  berechnet wird. Dabei wird die jeweilige Amplifikationseffizienz erfindungsgemäß in Abhängigkeit von der jeweils eingesetzten Menge an Target-Nukleinsäure bestimmt. 60 65

[0030] Die Ermittlung der stetigen Funktion erfolgt durch geeignete mathematische Verfahren und Algorithmen. Beispielsweise kann die Funktion durch einen polynomischen Fit höherer Ordnung beschrieben werden. Zur Berechnung ei-



ner Funktion hat sich ein polynomischer Fit 3., 4., 5., 6. oder 7. Ordnung als geeignet herausgestellt, wobei ein polynomischer Fit 4. Ordnung bevorzugt ist.

[0031] Die Ermittlung der Target-Mengen abhängigen Effizienz kann dann durch Ableitung einer stetig differenzierbaren Funktion  $F(C_p)$  der  $C_p$ -Werte in Abhängigkeit von einem Logarithmus der ursprünglich eingesetzten Kopienzahl oder umgekehrt erfolgen.

[0032] Die Amplifikationseffizienz  $E$  kann dann bestimmt werden nach der Gleichung

$$E = G^{-f(C_p)}$$

10 wobei  $f(C_p)$  die Ableitung der stetigen Funktion und  $G$  die Grundzahl des Logarithmus ist. Somit wird bei dieser Ausführungsform die Amplifikationseffizienz  $E$  einer bestimmten ursprünglichen Menge an Target-Nukleinsäure als die negative lokale 1. Ableitung der vorher ermittelten stetig differenzierbaren Funktion bestimmt.

[0033] Alternativ kann die Amplifikationseffizienz  $E$  bestimmt werden nach der Gleichung

$$15 \quad E = G^{-\frac{1}{f(\log(\text{conc}))}}$$

20 wobei  $\text{conc}$  die ursprünglich eingesetzte Menge an Nukleinsäure,  $f(\log(\text{conc}))$  die Ableitung der stetigen Funktion und  $G$  die Grundzahl des Logarithmus ist. Somit wird bei dieser Ausführungsform die Amplifikationseffizienz  $E$  einer bestimmten ursprünglichen Menge an Target-Nukleinsäure als die reziproke negative lokale 1. Ableitung der vorher ermittelten stetig differenzierbaren Funktion bestimmt.

[0034] Die erfindungsgemäße Effizienz-korrigierte Quantifizierung von Nukleinsäuren in Abhängigkeit von der Menge an Target-Nukleinsäure kann prinzipiell sowohl für Verfahren der absoluten Quantifizierung als auch für Verfahren der relativen Quantifizierung eingesetzt werden. Darüber hinaus ist eine derartige Effizienzkorrektur insbesondere auch bei Verfahren von Vorteil, bei denen eine relative Quantifizierung mithilfe einer sogenannten Kalibratorprobe normiert wird (ABI Prism 7700 Application Manual, Perkin Elmer), um den Einfluß unterschiedlicher Detektions sensitivitäten für Target- und Referenz-Nukleinsäure zu eliminieren.

[0035] Soll die absolute Menge an nachzuweisender Target-Nukleinsäure in einer Probe bestimmt werden, so besteht das Verfahren zur Quantifizierung einer Target-Nukleinsäure in einer Probe erfindungsgemäß aus folgenden Schritten

- a) Bestimmung der Amplifikationseffizienzen der Target-Nukleinsäure sowie eines internen oder externen Standards in Abhängigkeit von den jeweiligen Ausgangsmengen unter definierten Amplifikationsbedingungen
- b) Amplifikation der in der Probe enthaltenen Target-Nukleinsäure sowie des internen oder externen Standards unter den gleichen definierten Reaktionsbedingungen
- 35 c) Messung der Amplifikation von Target-Nukleinsäure und Standard in Echtzeit
- d) Berechnung der ursprünglichen Kopienzahl in der Probe durch Korrektur der aus Schritt c) abgeleiteten Kopienzahl mit Hilfe der in Schritt a) bestimmten Amplifikationseffizienzen

[0036] Vorteilhafterweise sind die Sequenzen von Target-Nukleinsäure und Standard weitgehend identisch. Bei der Auswahl der Sequenz für einen internen Standards muß jedoch berücksichtigt werden, dass Standard und Target-Nukleinsäure mit Hilfe des zur Verfügung stehenden Detektionssystems voneinander unterschieden werden können. Dies kann beispielsweise mit unterschiedlich markierten Hybridisationssonden für den Nachweis von Target-Nukleinsäure und internem Standard erfolgen. Idealerweise werden dabei Oligonukleotide als Detektionssonden verwendet, mit deren Hilfe minimale Sequenzunterschiede wie Punktmutationen voneinander unterschieden werden können.

45 [0037] Die Verwendung eines internen Standards hat dabei den Vorteil, dass in der Probe befindliche Inhibitoren ebenfalls die Amplifikation des Standards beeinflussen. Deshalb können Amplifikationseffizienz-Unterschiede minimiert werden.

[0038] Die Verwendung eines externen Standards hat dagegen den Vorteil, dass sich die Amplifikationsreaktionen von Target-Nukleinsäure und Standard nicht gegenseitig in kompetitiver Weise hinsichtlich ihrer Effizienz beeinflussen können. Darüber hinaus können die Amplifikationsprodukte von Standard und Target-Nukleinsäure in Parallelansätzen mit Hilfe des gleichen Detektionssystems, beispielsweise mit der gleichen Hybridisationssonde nachgewiesen werden. Nachteil sind hier mögliche unterschiedliche PCR-Effizienzen, bedingt durch Inhibitoren in der Probe. Dadurch bedingte Fehler in der Quantifizierung können jedoch durch eine erfindungsgemäße Effizienzkorrektur eliminiert werden.

55 [0039] Gegenstand der vorliegenden Erfindung im Zusammenhang mit relativer Quantifizierung ist auch ein Verfahren zur Quantifizierung einer Target-Nukleinsäure in einer Probe relativ zu einer Referenz-Nukleinsäure, umfassend die folgenden Schritte:

- a) Bestimmung der Amplifikationseffizienzen der Target-Nukleinsäure und der Referenz-Nukleinsäure in Abhängigkeit von der jeweiligen Ausgangskonzentration unter definierten Amplifikationsbedingungen
- 60 b) Amplifikation sowohl der in der Probe enthaltenen Target-Nukleinsäure als auch der in der Probe enthaltenen Referenz-Nukleinsäure unter den gleichen definierten Amplifikationsbedingungen
- c) Messung der Amplifikation der Target-Nukleinsäure und der Referenz-Nukleinsäure in Echtzeit
- d) Berechnung des ursprünglichen Verhältnisses von Target-Nukleinsäure und Referenz-Nukleinsäure in der Probe durch Korrektur des aus Schritt c) abgeleiteten Verhältnisses mit Hilfe der in Schritt a) bestimmten Amplifikationseffizienzen
- 65

[0040] Ein derartiges erfindungsgemäßes Verfahren eliminiert einerseits den Einfluß von in der untersuchten Probe möglicherweise enthaltenen Inhibitoren und korrigiert andererseits Fehler, die aufgrund der unterschiedlichen Amplifi-



kationseffizienz von Target-Nukleinsäure und Referenz-Nukleinsäure auftreten können.

[0041] Eine wesentliche Voraussetzung dieser erfindungsgemäßen Verfahren zur relativen Quantifizierung ist, dass sowohl die Amplifikationseffizienz der Target-Nukleinsäure als auch die Amplifikationseffizienz der Referenz-Nukleinsäure in Abhängigkeit von der ursprünglich vorliegenden Menge an Target- bzw. Referenz-Nukleinsäure bestimmt werden. Diese Bestimmungen erfolgen beide bevorzugt nach dem oben beschriebenen Verfahren durch Bestimmung einer Zykluszahl, bei der ein bestimmter Schwellenwert überschritten wird. 5

[0042] In einer bevorzugten Ausführungsform der relativen Quantifizierung wird die Probe in zwei Aliquots aufgeteilt und die Echtzeit Messung der Amplifikation von Target-Nukleinsäure und Referenz-Nukleinsäure erfolgt in getrennten Reaktionsgefäßen. Dadurch wird verhindert, dass sich die Amplifikationsreaktionen von Target-Nukleinsäure und Referenznukleinsäure hinsichtlich ihrer Effizienz beispielsweise durch Konkurrenz um Deoxynucleotide oder Taq-Polymerase gegenseitig beeinflussen. Darüber hinaus können Target-Nukleinsäure und Referenz-Nukleinsäure mit den gleichen Detektionssystemen, beispielsweise mit dem gleichen DNA-Bindestoff nachgewiesen werden. 10

[0043] Alternativ kann die Echtzeit Messung der Amplifikation von Target-Nukleinsäure und Referenz-Nukleinsäure aus einer Probe im gleichen Reaktionsgefäß mit unterschiedlich markierten Hybridisationssonden erfolgen. Dies ist insbesondere bei nur geringen Mengen an zur Verfügung stehendem Probenmaterial von Vorteil, weil auf diese Weise wird die Anzahl der erforderlichen PCR-Reaktionen halbiert wird. 15

[0044] Vorteilhafterweise werden die Schritte b) bis d) in einem parallelen Ansatz mit einer sogenannten Kalibratorprobe durchgeführt. Bei der Kalibratorprobe handelt es sich um eine Probe, bei der Target-Nukleinsäure und Referenz-Nukleinsäure in einem bestimmten, für jede Messung konstantem Verhältnis zueinander vorliegen. Anschließend wird das Verhältnis der für die Probe und für die Kalibrator-Probe ermittelten Quotienten als Maß für die ursprüngliche Menge an Target-Nukleinsäure in der Probe bestimmt. Dies hat den Vorteil, dass zusätzlich weitere systematische Fehler eliminiert werden, die auf einer unterschiedlichen Detektionssensitivität von Target-Nukleinsäure und Referenz-Nukleinsäure beruhen. Derartige systematische Fehler können beispielsweise auftreten durch unterschiedliche Hybridisationseigenschaften der Hybridisationssonden, oder – bei Fluoreszenzmarkierten Sonden – unterschiedliche Anregungseffizienz, Quantenausbeute, oder Kopplungseffizienz des Farbstoffes an die Sonde. Deshalb müssen die zu testende Probe und die Kalibratorprobe für jedes Experiment mit den gleichen Detektionsmitteln, d. h. mit der gleichen Charge von Fluoreszenzmarkierten Hybridisationssonden analysiert werden. 20 25

[0045] Gegenstand der Erfindung sind insbesondere auch solche Ausführungsformen der beschriebenen Verfahren zur Effizienz-korrigierten Quantifizierung von Nukleinsäuren, bei denen die Amplifikationsprodukte durch Hybridisationssonden detektiert werden, die auf viele unterschiedliche Arten mit einer detektierbaren Komponente markiert sein können. 30

[0046] Voraussetzung sowohl für die Effizienz-korrigierte Bestimmung der ursprünglichen Menge einer Target-Nukleinsäure als auch für die Bestimmung der Amplifikationseffizienzen an sich ist die Festlegung von Schwellenwertwerten sowie die anschließende Bestimmung einer Zykluszahl der jeweiligen Amplifikationsreaktion, bei der ein bestimmter Schwellenwert erreicht wird. Die Festlegung des Schwellenwertes kann dabei gemäß dem Stand der Technik auf verschiedene Arten erfolgen: 35

Gemäß dem Stand der Technik kann der Schwellenwert beispielsweise ein Signal sein, welches einem bestimmten Vielfachen der statistischen Varianz des Backgroundsignals entspricht (ABI Prism 7700 Application Manual, Perkin Elmer).

Alternativ kann die Bestimmung der Zykluszahl, bei der der Schwellenwert überschritten wird nach der sogenannten "Fit Point above Threshold" Methode erfolgen (LightCycler Operators Manual, B59-B68, Roche Molecular Biochemicals, 1999). 40

[0047] In einer weiteren Ausführungsform kann der Schwellenwert nicht als absoluter Wert, sondern als relativer Wert definiert werden, wenn unabhängig vom absoluten Signalwert der Verlauf der Amplifikationsreaktion in Abhängigkeit von der Zykluszahl bestimmt wird und anschließend eine n-te Ableitung berechnet wird. Wobei In diesem Fall kann das Überschreiten bestimmter Extrema als Überschreiten eines bestimmten Schwellenwertes definiert werden. (EP-Anmelde-Nr. 00106523.4). Diese Art der Schwellenwertfestlegung ist also unabhängig von der absoluten Signalstärke beispielsweise eines Fluoreszenzsignals. Deshalb ist sie besonders geeignet für diejenigen Ausführungsformen, bei denen Target-Nukleinsäure und Referenz-Nukleinsäure im selben Reaktionsgefäß amplifiziert werden und mit Hilfe verschiedener Fluoreszenzmarkierungen detektiert werden. Als besonders geeignet haben sich im Zusammenhang mit der Effizienz-korrigierten Quantifizierung von PCR-Produkten Verfahren erwiesen, bei denen das Maximum der 2. Ableitung als Maß für den Schwellenwert bestimmt wird. 45 50

[0048] Bei den für die erfindungsgemäßen Verfahren einzusetzenden Hybridisationssonden handelt es sich in der Regel um einzelsträngige Nukleinsäuren wie einzelsträngige DNA oder RNA bzw. deren Derivate oder alternativ auch PNAs, die bei der Annealing Temperatur der Amplifikationsreaktion mit der Target-Nukleinsäure hybridisieren. Üblicherweise haben diese Oligonukleotide eine Länge von 20 bis 100 Nukleotiden. 55

[0049] Die Markierung kann abhängig vom genauen Detektionsformat an jeder beliebigen Ribose- oder Phosphatgruppe des Oligonukleotids eingeführt werden. Bevorzugt sind Markierungen am 5' und 3' Ende des Nukleinsäuremoleküls.

[0050] Die Art der Markierung muß im Echtzeit-Modus der Amplifikationsreaktion detektierbar sein. Dies ist beispielsweise prinzipiell auch (aber nicht nur) möglich mithilfe von Markierungen, die nach dem Prinzip der NMR detektierbar sind. 60

[0051] Besonders bevorzugt sind Verfahren, bei denen die Detektion der amplifizierten Nukleinsäuren mit Hilfe von mindestens einer Fluoreszenz-markierten Hybridisationssonde erfolgt.

[0052] Dabei sind viele verschiedene Testführungen möglich. Als besonders geeignet in Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung haben sich die folgenden drei Detektionsformate erwiesen: 65



## (i) FRET-Hybridisationssonden

[0053] Für dieses Testformat werden 2 einzelsträngige Hybridisationssonden gleichzeitig verwendet, die komplementär zu benachbarten Stellen desselben Strangs der amplifizierten Target-Nukleinsäure sind. Beide Sonden sind mit unterschiedlichen Fluoreszenzkomponenten markiert. Bei Anregung mit Licht einer geeigneten Wellenlänge einer ersten Komponente überträgt diese nach dem Prinzip des Fluoreszenzresonanzenergietransfers die absorbierte Energie auf die zweite Komponente, sodass bei Bindung beider Hybridisationsproben an benachbarte Positionen des nachzuweisenden Target-Moleküls eine Fluoreszenzemission der zweiten Komponente gemessen werden kann.

[0054] Alternativ können ein Fluoreszenz-markierter Primer und nur eine markierte Oligonukleotidsonde verwendet werden (Bernard et al., Analytical Biochemistry 235, p. 1001-107 (1998)).

## (ii) TaqMan-Hybridisationssonden

[0055] Eine einzelsträngige Hybridisationssonde wird mit 2 Komponenten markiert. Bei Anregung der ersten Komponente mit Licht einer geeigneten Wellenlänge wird nach dem Prinzip des Fluoreszenz-Resonanzenergietransfers die absorbierte Energie auf die zweite Komponente, den sogenannten Quencher übertragen. Während des Annealing Schrittes der PCR Reaktion bindet die Hybridisationssonde an die Target-DNA und wird während der sich anschließenden Elongationsphase durch die 5'-3' Exonuklease-Aktivität der Taq-Polymerase degradiert. Dadurch werden die angeregte Fluoreszenzkomponente und der Quencher räumlich voneinander getrennt, sodass eine Fluoreszenzemission der ersten Komponente in gemessen werden kann.

## (iii) Molecular Beacons

[0056] Diese Hybridisationssonden sind ebenfalls mit einem einer ersten Komponente und einem Quencher markiert, wobei sich die Markierungen vorzugsweise an den beiden Enden der Sonde befinden. In Lösung befinden sich beide Komponenten aufgrund der Sekundärstruktur der Sonde in räumlicher Nähe zueinander. Nach Hybridisierung an die Target-Nukleinsäure werden beide Komponenten voneinander getrennt, sodass nach Anregung mit Licht einer geeigneten Wellenlänge die Fluoreszenzemission der ersten Komponente gemessen werden kann (Lizardi et al., US 5,118,801).

[0057] In den beschriebenen Ausführungsformen, bei denen in jeweils einem Reaktionsgefäß entweder nur die Target-Nukleinsäure oder nur die Referenz-Nukleinsäure oder ein externer Standard amplifiziert wird, kann das jeweilige Amplifikationsprodukt erfindungsgemäß auch durch einen DNA-Bindfarbstoff nachgewiesen werden, welcher bei Interaktion mit doppelsträngiger Nukleinsäure nach Anregung mit Licht einer geeigneten Wellenlänge ein entsprechendes Fluoreszenzsignal emittiert. Als besonders geeignet für diese Anwendung haben sich die Farbstoffe SybrGreen und SybrGold (Molecular Probes) erwiesen. Alternativ können auch interkalierende Farbstoffe verwendet werden.

## C) Effizienzkorrektur durch direkte Bestimmung der Amplifikationseffizienzen

## Absolute Quantifizierung

[0058] In einer bevorzugten Ausführungsform zur absoluten Quantifizierung einer Target-Nukleinsäure in einer Probe umfasst das erfindungsgemäße Verfahren die folgenden Schritte:

- Bestimmung der Amplifikationseffizienzen der Target-Nukleinsäure sowie eines internen oder externen Standards in Abhängigkeit von den jeweiligen Ausgangsmengen unter definierten Amplifikationsbedingungen
- Amplifikation der in der Probe enthaltenen Target-Nukleinsäure sowie des internen oder externen Standards unter den gleichen definierten Reaktionsbedingungen
- Messung der Amplifikation von Target-Nukleinsäure und Standard in Echtzeit
- Festlegung eines definierten Signalschwellenwerts
- Bestimmung der Zykluszahlen bei der Amplifikation von Target-Nukleinsäure und Standard, bei denen der Signalschwellenwert jeweils überschritten wird
- Bestimmung der ursprüngliche Kopienzahl  $N(T)_0$  der Target-Nukleinsäure in der Probe nach der Formel

$$N(T)_0 = N(S)_0 \cdot \frac{E(S)^{n_s}}{E(T)^{n_t}}$$

$N(S)_0$  = die ursprüngliche Menge an eingesetztem Standard

$E(S)$  = die zum jeweiligen Detektionszeitpunkt über die erfolgten Zyklen gemittelte Amplifikationseffizienz des Standards zu einem bestimmten Zyklus  $n$

$E(T)$  = die zum jeweiligen Detektionszeitpunkt über die erfolgten Zyklen gemittelte Amplifikationseffizienz des Targets zu einem bestimmten Zyklus  $n$

$n_s$  = die Zykluszahl, bei der Signalschwellenwert durch die Amplifikation der Standard-Nukleinsäure überschritten wird

$n_t$  = die Zykluszahl, bei der Signalschwellenwert durch die Amplifikation der Target-Nukleinsäure überschritten wird

[0059] Für die Berechnung von  $N(T)_0$  ergibt sich unter diesen Umständen:

$$N(T)_n = N(T)_0 \cdot E^{n_t} \text{ und}$$

$$N(S)_n = N(S)_0 \cdot E^{n_s}$$





[0060] Aufgrund der Tatsache, dass ein identischer Signalschwellenwert für Target- und Standard-Nukleinsäure festgelegt wird, ergibt sich approximativ:

$$N(T)_n = N(S)_n$$

5

[0061] Somit berechnet sich die ursprünglich in der Probe vorliegende Kopienzahl der Target-Nukleinsäure nach der Gleichung

$$N(T)_0 = N(S)_0 \cdot \frac{E(S)^{n_s}}{E(T)^{n_t}}$$

10

[0062] In einer alternativen Ausführungsform zur absoluten Quantifizierung einer Target-Nukleinsäure in einer Probe umfaßt das erfindungsgemäße Verfahren die folgenden Schritte:

- a) Bestimmung der Amplifikationseffizienzen der Target-Nukleinsäure sowie eines internen oder externen Standards in Abhängigkeit von den jeweiligen Ausgangsmengen unter definierten Amplifikationsbedingungen
- b) Amplifikation der in der Probe enthaltenen Target-Nukleinsäure sowie des internen oder externen Standards unter den gleichen definierten Reaktionsbedingungen
- c) Messung der Amplifikation von Target-Nukleinsäure und Standard in Echtzeit
- d) Festlegung eines definierten Signalschwellenwerts
- e) Bestimmung der Zykluszahlen bei der Amplifikation von Target-Nukleinsäure und Standard, bei denen der Signalschwellenwert jeweils überschritten wird
- f) Bestimmung der ursprüngliche Kopienzahl  $N(T)_0$  der Target-Nukleinsäure in der Probe nach der Formel

$$N(T)_0 = N(S)_0 \cdot \frac{\prod_{i=1}^n E(S_x)}{\prod_{i=1}^n E(T_x)}$$

25

$N(S)_0$  = die ursprüngliche Menge eingesetztem Standard

30

$E(S_n)$  = die Amplifikationseffizienz des Standards bei einem einzelnen Zyklus x

$E(T_n)$  = die Amplifikationseffizienz des Targets bei einem einzelnen Zyklus x

$\prod_{i=1}^n E(S_x)$  = Das Produkt der bestimmten Effizienzen aller Zyklen der Amplifikation des Standards bis zum Erreichen des Signalschwellenwerts bei Zyklus n.

$\prod_{i=1}^n E(T_x)$  = Das Produkt der bestimmten Effizienzen aller Zyklen der Amplifikation der Target-Nukleinsäure bis zum Erreichen des Signalschwellenwerts bei Zyklus n.

35

[0063] Dabei erfolgt die Bestimmung der Amplifikationseffizienzen von Target-Nukleinsäure und internem Standard bevorzugt wie beschrieben durch Bestimmung einer Zykluszahl, bei der ein bestimmter Signalschwellenwert überschritten wird.

[0064] Die Berechnung von  $N(T)_0$  ergibt sich erfindungsgemäß wie folgt:

40

$$N(T)_n = N(T)_0 \cdot E(T_1) \cdot \dots \cdot E(T_n) = N(T)_0 \cdot \prod_{i=1}^n E(T_x)$$

und

$$N(S)_n = N(S)_0 \cdot E(S_1) \cdot \dots \cdot E(S_n) = N(S)_0 \cdot \prod_{i=1}^n E(S_x)$$

45

[0065] Aufgrund der Tatsache, dass ein identischer Signalschwellenwert für Target- und Standard-Nukleinsäure festgelegt wird, ergibt sich approximativ:

50

$$N(T)_n = N(S)_n,$$

[0066] Somit berechnet sich die ursprünglich in der Probe vorliegende Kopienzahl der Target-Nukleinsäure nach der Gleichung

$$N(T)_0 = N(S)_0 \cdot \frac{\prod_{i=1}^n E(S_x)}{\prod_{i=1}^n E(T_x)}$$

55

60

[0067] Der Nachteil dieses Verfahrens liegt darin, daß die Effizienzen der jeweils ersten Zyklen einer Amplifikationsreaktion nicht bestimmt werden können, da die Menge an amplifizierter Nukleinsäure noch unterhalb der Nachweisgrenze jedes nach dem Stand der Technik verfügbaren Nachweissystems liegt.

[0068] Approximativ kann die Effizienz eines frühen Zyklus jedoch als das geometrische Mittel  $\Pi$  aller für die folgenden Zyklen ermittelten Effizienzen angenommen werden. Alternativ kann die nicht bestimmbare Effizienz eines frühen Zyklus mit der Effizienz gleich gesetzt werden, die für den ersten Zyklus ermittelt wurde, bei dem ein Amplifikationsprodukt nachweisbar war.

65



[0069] Eine besondere Ausführungsform der erfindungsgemäßen relativen Quantifizierung ist ein Verfahren zur Quantifizierung einer Target-Nukleinsäure in einer Probe relativ zu einer Referenz-Nukleinsäure, umfassend die folgenden Schritte:

- a) Bestimmung der Amplifikationseffizienzen der Target-Nukleinsäure und der Referenz-Nukleinsäure in Abhängigkeit von den Ausgangsmengen unter definierten Amplifikationsbedingungen
- b) Amplifikation sowohl der in der Probe enthaltenen Target-Nukleinsäure als auch der in der Probe enthaltenen Referenz-Nukleinsäure unter den gleichen definierten Amplifikationsbedingungen
- c) Messung der Amplifikation der Target-Nukleinsäure und der Referenz-Nukleinsäure in Echtzeit
- d) Festlegung eines definierten Signalschwellenwerts
- e) Bestimmung der Zykluszahlen bei der Amplifikation von Target-Nukleinsäure und Referenz-Nukleinsäure, bei denen der Signalschwellenwert jeweils überschritten wird
- f) Berechnung des ursprünglichen Verhältnisses von Target-Nukleinsäure und Referenz-Nukleinsäure in der Probe gemäß der Formel

$$N(T)_0 / N(R)_0 = \frac{E(R)^{nr}}{E(T)^{nt}}$$

$N(T)_0$  = die ursprüngliche Menge an Target-Nukleinsäure

$N(R)_0$  = die ursprüngliche Menge an Referenz-Nukleinsäure

$E(R)$  = die zum jeweiligen Detektionszeitpunkt über die erfolgten Zyklen gemittelte Amplifikationseffizienz der Referenz-Nukleinsäure zu einem bestimmten Zyklus  $n$

$E(T)$  = die zum jeweiligen Detektionszeitpunkt über die erfolgten Zyklen gemittelte Amplifikationseffizienz der Target-Nukleinsäure zu einem bestimmten Zyklus  $n$

$nr$  = die Zykluszahl, bei der Signalschwellenwert durch die Amplifikation der Referenz-Nukleinsäure überschritten wird

$nt$  = die Zykluszahl, bei der Signalschwellenwert durch die Amplifikation der Target-Nukleinsäure überschritten wird

[0070] Für die Berechnung von  $N(T)_0$  ergibt sich unter diesen Umständen:

$$N(T)_n = N(T)_0 \cdot E(T)^{nt} \text{ und}$$

$$N(R)_n = N(R)_0 \cdot E(R)^{nr}$$

[0071] Aufgrund der Tatsache, dass ein identischer Signalschwellenwert für Target- und Standard-Nukleinsäure festgelegt wird, ergibt sich approximativ:

$$N(T)_n = N(R)_n,$$

[0072] Somit berechnet sich die ursprünglich in der Probe vorliegende Kopienzahl der Target-Nukleinsäure nach der Gleichung

$$N(T)_0 / N(R)_0 = \frac{E(R)^{nr}}{E(T)^{nt}}$$

[0073] In einer alternativen Ausführungsform zur relativen Quantifizierung einer Target-Nukleinsäure in einer Probe umfaßt das erfindungsgemäße Verfahren die folgenden Schritte:

- a) Bestimmung der Amplifikationseffizienzen der Target-Nukleinsäure und der Referenz-Nukleinsäure in Abhängigkeit von den Ausgangsmengen unter definierten Amplifikationsbedingungen
- b) Amplifikation sowohl der in der Probe enthaltenen Target-Nukleinsäure als auch der in der Probe enthaltenen Referenz-Nukleinsäure unter den gleichen definierten Amplifikationsbedingungen
- c) Messung der Amplifikation der Target-Nukleinsäure und der Referenz-Nukleinsäure in Echtzeit
- d) Festlegung eines definierten Signalschwellenwerts
- e) Bestimmung der Zykluszahlen bei der Amplifikation von Target-Nukleinsäure und Referenz-Nukleinsäure, bei denen der Signalschwellenwert jeweils überschritten wird
- f) Berechnung des ursprünglichen Verhältnisses von Target-Nukleinsäure und Referenz-Nukleinsäure in der Probe gemäß der Formel

$$N(T)_0 / N(R)_0 = \frac{\prod_{i=1}^n E(R_i)}{\prod_{i=1}^n E(T_i)}$$

$N(T)_0$  = die ursprünglich in der Probe vorhandene Menge an Target-Nukleinsäure

$N(R)_0$  = die ursprünglich in der Probe vorhandene Menge an Referenz-Nukleinsäure

$E(R_n)$  = die Amplifikationseffizienz der Referenz-Nukleinsäure bei einem einzelnen Zyklus  $n$

$E(T_n)$  = die Amplifikationseffizienz der Target-Nukleinsäure bei einem einzelnen Zyklus  $n$   $\prod E(T)$  = Das Produkt der be-



stimmten Effizienzen aller Zyklen der Amplifikation der Target-Nukleinsäure bis zum Erreichen des Signalschwellenwerts bei Zyklus  $n$   $\prod_{i=1}^n E(R)$  = Das Produkt der bestimmten Effizienzen aller Zyklen der Amplifikation der Referenz-Nukleinsäure bis zum Erreichen des Signalschwellenwerts bei Zyklus  $n$

[0074] Die Berechnung des ermittelten Verhältnisses in Schritt f) ergibt sich erfindungsgemäß wie folgt:

$$N(T)_n = N(T)_0 \cdot E(T_1) \cdot \dots \cdot E(T_n) = N(T)_0 \cdot \prod_{i=1}^n E(T_x) \quad (1)$$

$$N(R)_n = N(R)_0 \cdot E(R_1) \cdot \dots \cdot E(R_n) = N(R)_0 \cdot \prod_{i=1}^n E(R_x) \quad (2)$$

wobei  $N(T)_n$  = Menge an Target-DNA am Signalschwellenwert  
und  $N(R)_n$  = Menge an Referenz-DNA am Signalschwellenwert

[0075] Aus (1) und (2) folgt:

$$\frac{N(T)_n}{N(R)_n} = \frac{N(T)_0 \cdot \prod_{i=1}^n E(T_x)}{N(R)_0 \cdot \prod_{i=1}^n E(R_x)} \quad (3)$$

[0076] Daraus folgt:

$$\frac{N(T)_0}{N(R)_0} = \frac{N(T)_n \cdot \prod_{i=1}^n E(R_x)}{N(R)_n \cdot \prod_{i=1}^n E(T_x)} \quad (4)$$

[0077] Aufgrund der Tatsache, dass ein identischer Signalschwellenwert für Target-Nukleinsäure und Referenz-Nukleinsäure festgelegt wird, ist approximativ davon auszugehen, dass

$$N(T)_n = N(R)_n \text{ ist.}$$

[0078] Unter dieser Voraussetzung ergibt sich dann ausgehend von Gleichung (4) für das ursprüngliche Verhältnis von Target-Nukleinsäure und Referenz-Nukleinsäure die Gleichung

$$N(T)_0 / N(R)_0 = \prod_{i=1}^n E(R_x) / \prod_{i=1}^n E(T_x) \quad (5)$$

[0079] Analog zur absoluten Quantifizierung kann die Effizienz eines nicht bestimmbar frühen Zyklus als das geometrische Mittel  $\Pi$  aller für die folgenden Zyklen ermittelten Effizienzen angenommen werden. Alternativ kann die Effizienz eines frühen Zyklus mit der Effizienz gleich gesetzt werden, die für den ersten Zyklus ermittelt wurde, bei dem ein Amplifikationsprodukt nachweisbar war.

#### Relative Quantifizierung und Normierung auf Kalibrator

[0080] Die approximative Annahme  $N(T)_n = N(R)_n$  gilt jedoch dann nicht, wenn Target-Nukleinsäure und Referenz-Nukleinsäure mit unterschiedlichen Sensitivitäten detektiert werden.

[0081] Vorteilhafterweise werden dann zur Eliminierung systematischer Fehler jedoch aufgrund der Detektion der Amplifikationsprodukte bei dieser Ausführungsform zusätzlich die Schritte b), c), e) und f) der oben beschriebenen Verfahren mit einer Kalibrator-Probe durchgeführt und anschließend das Verhältnis der für die Probe und für die Kalibrator-Probe ermittelten Quotienten als Maß für die ursprüngliche Menge an Target-Nukleinsäure in der Probe bestimmt.

[0082] Erfindungsgemäß wird deshalb in einem Parallellansatz eine Kalibratorprobe vermessen und als Maß für die ursprüngliche Menge an Target-Nukleinsäure in der Probe das Verhältnis der für die Probe und für die Kalibrator-Probe ermittelten Quotienten  $N(T)_0 / N(R)_0$  bestimmt.

[0083] Dabei ergibt sich aus Gleichung (4) unter Verwendung der Indices

A für zu analysierende Probe, und

K für Kalibratorprobe

$$\frac{N(T)_{0A}}{N(R)_{0A}} \bigg/ \frac{N(T)_{0K}}{N(R)_{0K}} = \frac{\frac{N(R)_{nA} \cdot \prod_{i=1}^n E_A(R_x)}{N(T)_{nA} \cdot \prod_{i=1}^n E_A(T_x)}}{\frac{N(R)_{nK} \cdot \prod_{i=1}^n E_K(R_x)}{N(T)_{nK} \cdot \prod_{i=1}^n E_K(T_x)}} \quad (6)$$

[0084] Aufgrund der Tatsache, dass für die zu analysierende Probe und für die Kalibratorprobe ein identischer Signalschwellenwert festgesetzt ist und durch die Verwendung identischer Mittel zur Detektion von Target- und Referenz-Amplicons in der Probe und in der Kalibratorprobe ergibt sich für das Verhältnis des für die Probe und für die Kalibrator-



probe ermittelten Quotienten:

$$\frac{N(R)_{nA}}{N(T)_{nA}} \bigg/ \frac{N(R)_{nK}}{N(T)_{nK}} = 1$$

[0085] Daraus ergibt sich für das Verhältnis der Quotienten aus zu analysierender Probe und Kalibratorprobe:

$$\frac{N(T)_{0A}}{N(R)_{0A}} \bigg/ \frac{N(T)_{0K}}{N(R)_{0K}} = \frac{\prod_{1-n} E_A(R_x) * \prod_{1-n} E_K(T_x)}{\prod_{1-n} E_A(T_x) * \prod_{1-n} E_K(R_x)} \quad (7)$$

[0086] Folglich kann auf diese Weise ein relativer Wert für die ursprüngliche Kopienzahl an Target-Nukleinsäure in der Probe erhalten werden, bei dem sowohl systematische Fehler aufgrund von verschiedenen Amplifikationseffizienzen als auch aufgrund von unterschiedlich Detektionssensitivitäten eliminiert worden sind. Einzige Voraussetzung für die Richtigkeit des ermittelten Wertes ist die begründete Annahme, dass bei absolut identischen Pufferbedingungen die Amplifikations- und Detektionseffizienzen in verschiedenen Reaktionsgefäßen ebenfalls identisch sind.

#### D) Implizite Effizienzkorrektur bei Verwendung einer Kalibratorprobe

[0087] Darüber hinaus ist die erfindungsgemäße konzentrationsabhängige Effizienzkorrektur für Quantifizierungsverfahren geeignet, bei denen die Amplifikationseffizienz nicht direkt bestimmt wird, sondern nur indirekt in das Quantifizierungsergebnis mit eingeht.

[0088] Dies kann beispielsweise der Fall sein bei Verfahren zur relativen Quantifizierung, bei denen das Ergebnis auf eine Kalibratorprobe normiert wird, um den Einfluß unterschiedlicher Detektionssensitivitäten für Target- und Referenz-Nukleinsäure zu eliminieren.

[0089] Bestandteil der vorliegenden Erfindung sind deshalb auch Verfahren zur relativen Quantifizierung einer Target-Nukleinsäure im Verhältnis zu einer Referenznukleinsäure und normiert auf eine Kalibratorprobe, umfassend die folgenden Schritte:

- a) Herstellung einer gemeinsamen oder zwei getrennter Verdünnungsreihen von Target-Nukleinsäure und Referenz-Nukleinsäure
- b) Amplifikation der verschiedenen Verdünnungen von Target-Nukleinsäure und Referenz-Nukleinsäure unter definierten Reaktionsbedingungen, wobei die Amplifikation der Nukleinsäure in Echtzeit gemessen wird
- c) Festsetzung von definierten Signalschwellenwerten für Target-Nukleinsäure und Referenz-Nukleinsäure
- d) Bestimmung der Zykluszahlen  $C_p$ , bei denen die für Target-Nukleinsäure und Referenz-Nukleinsäure definierten Signalschwellenwerte in jeder Verdünnung überschritten werden
- e) Erstellung einer stetig differenzierbaren Funktion der in d) bestimmten  $C_p$ -Werte in Abhängigkeit von einem Logarithmus der eingesetzten Mengen an Target-Nukleinsäure sowie Erstellung einer stetig differenzierbaren Funktion der bestimmten  $C_p$ -Werte in Abhängigkeit von einem Logarithmus der eingesetzten Mengen an Referenz-Nukleinsäure
- f) Bestimmung der  $C_p$ -Werte für Target-Nukleinsäure und Referenz-Nukleinsäure sowohl in der zu analysierenden Probe als auch in einer Kalibratorprobe
- g) Zuordnung der in Schritt f) gemessenen  $C_p$ -Werte zu bestimmten Funktionswerten der in Schritt e) ermittelten Funktionen
- h) Bildung der Quotienten der Funktionswerte aus g) von Target-Nukleinsäure und Referenz-Nukleinsäure sowohl für die zu analysierende Probe als auch für die Kalibratorprobe
- i) Bestimmung des Verhältnisses der Quotienten aus h) als Maß für die ursprünglich in der Probe enthaltenen Menge an Target-DNA.

[0090] Alternativ kann ein derartiges erfindungsgemäßes Verfahren zur relativen Quantifizierung einer Target-Nukleinsäure im Verhältnis zu einer Referenznukleinsäure und normiert auf eine Kalibratorprobe, die folgenden Schritte umfassen:

- a) Herstellung einer gemeinsamen oder zwei getrennter Verdünnungsreihen von Target-Nukleinsäure und Referenz-Nukleinsäure
- b) Amplifikation der verschiedenen Verdünnungen von Target-Nukleinsäure und Referenz-Nukleinsäure unter definierten Reaktionsbedingungen, wobei die Amplifikation der Nukleinsäure in Echtzeit gemessen wird
- c) Festsetzung von definierten Signalschwellenwerten für Target-Nukleinsäure und Referenz-Nukleinsäure
- d) Bestimmung der Zykluszahlen  $C_p$ , bei denen die für Target-Nukleinsäure und Referenz-Nukleinsäure definierten Signalschwellenwerte in jeder Verdünnung überschritten werden
- e) Erstellung einer stetig differenzierbaren Funktion des Logarithmus der eingesetzten Mengen an Target-Nukleinsäure in Abhängigkeit von den in d) bestimmten  $C_p$ -Werten sowie Erstellung einer stetig differenzierbaren Funktion eines Logarithmus der eingesetzten Mengen an Referenz-Nukleinsäure in Abhängigkeit von den bestimmten  $C_p$ -Werten



- f) Bestimmung der Cp-Werte für Target-Nukleinsäure und Referenz-Nukleinsäure sowohl in der zu analysierenden Probe als auch in einer Kalibratorprobe  
 g) Zuordnung der in Schritt f) gemessenen Cp-Werte zu bestimmten Funktionswerten der in Schritt e) ermittelten Funktionen  
 h) Bildung der Quotienten der Funktionswerte aus g) von Target-Nukleinsäure und Referenz-Nukleinsäure sowohl für die zu analysierende Probe als auch für die Kalibratorprobe  
 i) Bestimmung des Verhältnisses der Quotienten aus h) als Maß für die ursprünglich in der Probe enthaltenen Menge an Target-DNA.

[0091] Erfindungsgemäß werden die stetig differenzierbaren Funktionen aus Schritt e), die linear oder nicht-linear sein können, mithilfe eines polynomischen Fits vorzugsweise 3., 4., 5., 6., oder 7. Ordnung ermittelt.

[0092] Inwieweit die genannten stetig differenzierbaren Funktionen linear oder nichtlinear sind, hängt von den Ausgangskonzentrationen von Target- bzw. Referenznukleinsäure in der bzw. den Verdünnungsreihen ab. Bei niedrigeren Ausgangskonzentration ist tendenziell davon auszugehen, dass kein linearer Zusammenhang zwischen dem Logarithmus der jeweiligen Konzentration sowie dem für die jeweilige Konzentration gemessenen Cp-Wert besteht. Davon abgesehen ist der Verlauf der genannten Funktionen von den jeweiligen experimentellen Bedingungen und von der jeweiligen Target-Sequenz abhängig, sodass diese Funktionen empirisch ermittelt werden müssen und nicht aufgrund theoretischer Überlegungen abgeleitet werden können.

[0093] Die beschriebenen Verfahren zur Normierung mithilfe einer Kalibratorprobe sind auch und insbesondere dann anwendbar, wenn sich die Amplifikationseffizienzen im Rahmen der zu analysierenden Ausgangsmengen an Target-Nukleinsäure oder Referenz-Nukleinsäure ändern. Dadurch wird die Abhängigkeit der Amplifikationseffizienzen von den jeweiligen ursprünglich vorhandenen Kopienzahlen von Target-Nukleinsäure bzw. Referenz-Nukleinsäure indirekt berücksichtigt. Mit Hilfe der erfindungsgemäßen Quantifizierungsmethoden können deshalb auch geringe Ausgangskonzentration an Target-Nukleinsäure mit großer Genauigkeit bestimmt werden.

[0094] Die Validität einer derartigen Quantifizierung ergibt sich aufgrund der folgenden Überlegungen: Innerhalb den Schritte a) bis e) der beschriebenen Verfahren werden anhand der für die Verdünnungsreihe gemessenen Zykluszahlen (Cp-Werte) Funktionen erstellt, die im Folgenden als Kalibrationskurven bezeichnet werden. Die Berechnung der Kalibrationskurven aus den einzelnen Messwerten erfolgt mittels mathematischer Verfahren, zum Beispiel mit Hilfe eines polynomischen Fits. Für den Fall, dass die Effizienz für verschiedene Ausgangskonzentrationen an Target-Nukleinsäure konstant bleibt, stellt die Kalibrationskurve eine lineare Funktion dar.

[0095] Ein Beispiel für derartige Kalibrationskurven ist in Abb. 1 schematisch dargestellt. Auf der Abszisse des Graphen ist die Zykluszahl aufgetragen, bei der jeweils der definierte Signalschwellenwert überschritten wird. Auf der Ordinate des Graphen ist der Logarithmus einer bestimmten relativen Konzentration aufgetragen. (Die Grundzahl des Logarithmus kann beliebig gewählt werden, solange sie innerhalb des experimentellen Ansatzes nicht verändert wird). Unter der relativen Konzentration ist in diesem Zusammenhang eine Maßzahl ohne Einheit zu verstehen, die abhängig von der jeweiligen Detektionseffizienz, aber proportional zur tatsächlich eingesetzten Menge an Target- bzw. Referenznukleinsäure ist.

(Bei dem Beispiel von Abb. 1 bleibt die Amplifikationseffizienz der Referenznukleinsäure für verschiedene Verdünnungen konstant. Die Amplifikationseffizienz der Target-Nukleinsäure ist jedoch bei niedrigen Konzentrationen vergleichsweise erhöht).

[0096] Innerhalb der folgenden Schritte f) und g) der beschriebenen Verfahren werden für die zu analysierende Probe die Zykluszahlen (Cp-Werte) für Target-Nukleinsäure (Cp-Tar) und Referenz-Nukleinsäure (Cp-Ref) ermittelt, bei der die festgesetzten Signalschwellenwerte überschritten werden. Anhang der zuvor bestimmten Kalibrationskurven werden den für die Probe bestimmten Zykluszahlen Cp-Tar und Cp-Ref Funktionswerte  $\log(R_{\text{conc}}(\text{Tar}))$  und  $\log(R_{\text{conc}}(\text{Ref}))$  zugeordnet.

[0097] Zusätzlich ist es bei einer relativen Quantifizierung noch vorteilhaft, den Einfluß unterschiedlicher Detektionseffizienzen für Target-Nukleinsäure und Referenz-Nukleinsäure zu eliminieren. Dies kann mithilfe einer sogenannten Kalibratorprobe geschehen. In gleicher Weise werden deshalb für die zu analysierende Probe werden deshalb auch für eine Kalibratorprobe die Cp-Werte für Target-Nukleinsäure und Referenz-Nukleinsäure bestimmt und ebenfalls entsprechenden Funktionswerten zugeordnet.

[0098] Im folgenden gilt jedoch die Annahme, dass innerhalb eines Experiments die Detektionseffizienz konstant bleibt, d. h. eine experimentell bestimmte relative Konzentration ist proportional zur tatsächlich in der jeweiligen Probe vorhandenen Kopienzahl an Target- bzw. Referenz-Nukleinsäure. Somit gilt zunächst für jede beliebige Probe einschließlich des Kalibrators:

$$A_{\text{Conc}}(\text{Tar}) = K_{\text{Tar}} \cdot R_{\text{conc}}(\text{Tar}) \quad (1)$$

$$A_{\text{Conc}}(\text{Ref}) = K_{\text{Ref}} \cdot R_{\text{conc}}(\text{Ref}) \quad (2)$$

wobei

$A_{\text{Conc}}(\text{Tar})$  = die tatsächlich in einer Probe vorhandene Kopienzahl an Target-Nukleinsäure

$A_{\text{Conc}}(\text{Ref})$  = die tatsächlich in einer Probe vorhandene Kopienzahl an Referenz-Nukleinsäure

$K_{\text{Tar}} = \text{const}$

$K_{\text{Ref}} = \text{const}$

$R_{\text{conc}}(\text{Tar})$  = relative Konzentration der Target-Nukleinsäure (ohne Einheit)

$R_{\text{conc}}(\text{Ref})$  = relative Konzentration der Referenz-Nukleinsäure (ohne Einheit)

[0099] Dabei handelt es sich bei den Konstanten  $K_{\text{Tar}}$  und  $K_{\text{Ref}}$  um Größen, deren absolute Werte von der jeweiligen Detektionseffizienz, abhängig sind. Mit anderen Worten: Diese Konstanten berücksichtigen Faktoren wie beispielsweise



eine unterschiedliche Quantenausbeute der Fluoreszenzmarkierungen oder unterschiedliche Hybridisationskinetiken der Hybridisierungs sonden und sind deshalb in der Regel nicht identisch.

[0100] Gemäß Schritt h) des oben beschriebenen Verfahrens wird der Quotient

5  $R_{conc} (Tar)$

$R_{conc} (Ref)$

gebildet.

10 [0101] Aus (1) und (2) folgt:

$$\frac{R_{conc} (Tar)}{R_{conc} (Ref)} = \frac{K_{(Ref)} \times A_{conc} (Tar)}{K_{(Tar)} \times A_{conc} (Ref)} \quad (3)$$

15 [0102] Diese Gleichung gilt gleichermaßen sowohl für die zu analysierende Probe als auch für die Kalibrationsprobe, da für beide Proben die gleichen Detektionsmittel verwendet werden.

$$\frac{R_{conc} (Tar)_{Kal}}{R_{conc} (Ref)_{Kal}} = \frac{K (Ref)}{K (Tar)} \times \frac{A_{conc} (Tar)_{Kal}}{A_{conc} (Ref)_{Kal}} \quad (4)$$

[0103] Gemäß Schritt i) des oben beschriebenen Verfahrens wird im Anschluss daran das Verhältnis der beiden ermittelten Quotienten bestimmt:

$$\frac{\frac{R_{conc} (Tar)}{R_{conc} (Ref)}}{\frac{R_{conc} (Tar)_{Kal}}{R_{conc} (Ref)_{Kal}}} = \frac{\frac{K (Ref) \times A_{conc} (Tar)}{K (Tar) \times A_{conc} (Ref)}}{\frac{K (Ref) \times A_{conc} (Tar)_{Kal}}{K (Tar) \times A_{conc} (Ref)_{Kal}}} \quad (5)$$

35 [0104] Daraus folgt, daß die von der jeweiligen Detektionseffizienz anhängigen Konstanten eliminiert werden können:

$$\frac{\frac{R_{conc} (Tar)}{R_{conc} (Ref)}}{\frac{R_{conc} (Tar)_{Kal}}{R_{conc} (Ref)_{Kal}}} = \frac{\frac{A_{conc} (Tar)}{A_{conc} (Ref)}}{\frac{A_{conc} (Tar)_{Kal}}{A_{conc} (Ref)_{Kal}}} \quad (6)$$

[0105] Daraus ergibt sich, dass die Verhältnisse der ermittelten relativen Konzentrationen von Target-Nukleinsäure zu Referenz-Nukleinsäure normiert auf das Verhältnis der relativen Konzentration von Target-Nukleinsäure zu Referenz-Nukleinsäure im Kalibrator identisch sind mit den Verhältnissen der absoluten Kopienzahlen von Target-Nukleinsäure und Referenz-Nukleinsäure in den jeweils analysierten Proben.

50 [0106] Somit stellt dieses erfindungsgemäße Verfahren eine exakte Methode zur relativen Quantifizierung von Nukleinsäuren dar, bei der

- einerseits unterschiedliche Effizienzen von PCR-Reaktionen berücksichtigt werden, ohne dass eine direkte Bestimmung der Effizienz erforderlich ist, und
- andererseits aufgrund der Verwendung einer Kalibratorprobe der Einfluß der von verschiedenen unkontrollierbaren Faktoren abhängigen Detektionseffizienz eliminiert wird.

60 [0107] Die folgenden Beispiele erläutern die Erfindung weiter:

#### Beispiel 1

Amplifikation von Cyclophilin A (CycA) und Porphobilinogen Deaminase (PBGD) cDNA's

65 [0108] Aus 3 kommerziell erhältlichen (Clontech) Gesamt-RNA's isoliert aus einer HeLa-Zelllinie, Nebennierendrüsengewebe und Hirn-Gewebe wurden mit Hilfe einer Reversen Transkriptase Reaktion cDNA's unter folgenden Bedingungen synthetisiert:

1 µg Gesamt-RNA



1 × AMV Reaktionspuffer  
 5 mM MgCl<sub>2</sub>  
 1 mM Deoxynucleotidmix  
 0.0625 mM randomisierte Hexamere  
 50 Units RNase  
 10 Units AMV Reverse Transkriptase  
 ad 20 µl H<sub>2</sub>O

[0109] Für die cDNA-Synthese wurden sämtliche Ansätze für 10 Minuten bei 25°C, 60 Minuten bei 42°C und 5 Minuten bei 95°C inkubiert. Danach wurde auf 4°C abgekühlt.

[0110] Anschließend erfolgte die Amplifikationsreaktion und deren Echtzeitmessung im FRET-HybProbe Format auf einem Light Cycler Instrument (Roche Diagnostics GmbH). Dabei wurde jeder Ansatz unter folgenden Bedingungen amplifiziert:

1 × LC-Fast Start DNA-Master Hybridisation Probes (Roche Diagnostics GmbH)  
 3 mM MgCl<sub>2</sub>  
 0.5 mM je Primer  
 0.2 µM Fluorescein-Sonde  
 0.2 µM LC-RED640-Sonde  
 ad 20 µl H<sub>2</sub>O

[0111] Für die Amplifikation der CycA Sequenz (Cyclophilin A) wurden Primer mit SEQ. ID. NO: 1 und SEQ. ID. NO: 2 verwendet. Zur Detektion des CycA Produktes wurden eine Fluoresceinmarkierte Sonde der SEQ. ID. NO: 3 und eine LC-RED640-markierte Sonde der SEQ. ID. NO: 4 verwendet. Zur Amplifikation der PBGD Sequenz (Porphobilinogen) wurden Primer der SEQ. ID. NO: 5 und SEQ. ID. NO: 6 verwendet. Für die Detektion von PBGD wurden eine Fluorescein-markierte Sonde der SEQ. ID. NO: 7 sowie eine LC-RED640-markierte Sonde gemäß SEQ. ID. NO: 8 eingesetzt.

[0112] Der Ansatz wurde unter folgenden PCR-Bedingungen im Light Cycler amplifiziert:

Denaturierung:

95°C 10 min

Amplifikation: 45x

95°C 10 sec 20.0°C/sec

55°C 10 sec 20.0°C/sec

72°C 15 sec 3.0°C/sec

Abkühlung:

40°C 30 sec

[0113] Nach jeder Inkubation bei 55°C erfolgte eine Fluoreszenzmessung entsprechend den Angaben des Herstellers. Der Signalschwellenwert (Cp-Wert) wurde als Maximum der 2. Ableitung der Amplifikationsreaktion in Abhängigkeit von der Zykluszahl bestimmt.

## Beispiel 2

### Bestimmung der Effizienz der Amplifikation von CycA und PBGD

[0114] Zur Bestimmung der Amplifikationseffizienzen von CycA und PBGD wurde die aus HeLa-Gesamt-RNA synthetisierte cDNA in 1 : 5-Schritten verdünnt (insgesamt 5 Verdünnungsstufen). Mit jeder Verdünnungsstufe wurde eine 3-fache Bestimmung des Signalschwellenwertes (Cp-Wertes) auf dem LightCycler durchgeführt. Dies wurde sowohl für CycA als auch für PBGD durchgeführt.

[0115] Zur Bestimmung der Fit-Koeffizienten wurden zwei verschiedene Funktionen erstellt, in der die für die jeweilige Konzentration ermittelte Zykluszahl Cp in Abhängigkeit vom dekadischen Logarithmus der eingesetzten cDNA-Konzentration bestimmt wurde.

#### a) Erstellung einer linearen Funktion

[0116] Unter der Annahme identischer Effizienzen für unterschiedliche Ausgangskonzentrationen einer Nukleinsäure wurden die beiden jeweiligen Amplifikationseffizienzen für Target-Nukleinsäure und Referenz-Nukleinsäure nach der Gleichung

$$E = G^{-\frac{1}{f(\log(\text{conc}))}}.$$

[0117] Bestimmt.  $f(\log(\text{conc}))$  wurde dabei als Steigung der Regressionsgraden zu den in Abb. 2a und 2b dargestellten Funktionen ermittelt. Dabei wurde für die Target-Nukleinsäure CycA eine Effizienz  $E = 2,62$  und für die Referenz-nukleinsäure PBGD eine Effizienz  $E = 1,97$  ermittelt.

#### b) Erstellung einer nicht-linearen Funktion mit Hilfe eines erfindungsgemäßen polynomische Fits 4. Ordnung

[0118] Auf Basis derselben Messwerte wurden für Target- und Referenz-Nukleinsäure Funktionen des Logarithmus der ermittelten relativen Konzentrationen in Abhängigkeit von den gemessenen Cp-Werten durch Berechnung eines polynomischen Fits 4. Ordnung erstellt. Diese Funktionen sind in den Abb. 3a (Target-Nukleinsäure) und 3b (Referenz-Nukleinsäure) dargestellt.



[0119] Die ermittelten Fit Parameter für die Target-Nukleinsäure (CycA) waren:

A(Offset) = 11.3974946

B (linear) = -0.1

C(quadrat.) = -0.0721349

5 D = 0.0044516

E = -8.214E-05

[0120] Die ermittelten Fit-Parameter für die Referenz-Nukleinsäure waren:

A(Offset) = 9.98347024

B(linear) = -0.29359011

10 C = 0

D = 0

E = 0

[0121] Wie aus den Abbildungen bzw. den ermittelten Fit-Parametern ersichtlich, ergibt sich für die Referenznukleinsäure eine annähernd lineare Funktion. Daraus folgt, dass eine Amplifikation der Referenznukleinsäure im gemessenen

15 Konzentrationsbereich mit weitgehend konstanter Effizienz erfolgt.

[0122] Für die Targetnukleinsäure CycA wurde dagegen auf Basis der erhaltenen Cp-Werte eine nicht lineare Funktion ermittelt. Dadurch ist gezeigt, dass die Effizienz der Amplifikationsreaktion im gemessenen Konzentrationsbereich für CycA signifikant von der ursprünglich in der Probe enthaltenen Kopienzahl abhängig ist.

20

### Beispiel 3

Kalibrator-normierte Bestimmung des ursprünglichen Verhältnisses von Target und Referenznukleinsäure mit und ohne implizierter Korrektur der Amplifikationseffizienz

25 [0123] Unter den in Beispiel 1 geschilderten Bedingungen sollte das bestimmte Verhältnis von ursprünglicher Menge an CycA und PBGD unabhängig von der jeweils amplifizierten Menge des verwendeten Probenmaterials sein. Daher wurde die Bestimmung des Verhältnisses für verschiedene Mengen an eingesetzter Proben RNA dazu benutzt, die Auswirkung einer Effizienzkorrektur auf Grundlage der erhaltenen Messwerten zu überprüfen.

30 [0124] Die ursprünglichen Verhältnisse von Target (CycA)- und Referenz (PBGD)-Nukleinsäure in Nebennierendrüsens-RNA und Hirn-RNA wurden mit jeweils 3 Verdünnungsstufen (für jede Verdünnungsstufe wurden Doppelbestimmungen durchgeführt) der cDNA's bestimmt. Ausgehend von den gemessenen Daten wurde der Quotient des Verhältnisses der relativen Konzentrationen von CycA und PBGD zwischen der jeweils analysierten Probe und einer Kalibrator-Probe bestimmt. Als Kalibrator wurde Gesamt-RNA aus HeLa-Zellen verwendet. Diese Bestimmung erfolgte einerseits mit einer angenommenen Amplifikationseffizienz von jeweils 2,00 für CycA und PBGD, sowie andererseits mit Hilfe

35 der in Beispiel 2 ermittelten linearen bzw. nicht-linearen Funktionen.

40

45

50

55

60

65





Tabelle 1 zeigt die auf den Kalibrator normierten Verhältnisse von Target /Referenz-Nukleinsäure

	ohne Effizienz- korrektur	Effizienzkorrek- tur mit linearer Fit-Funktion	Implizite Effi- zienzkorrektur mit nicht-linearer Fit-Funktion
<b>Nebennierendrüse 40ng</b>	<b>1.03</b>	<b>1.18</b>	<b>1.41</b>
<b>Nebennierendrüse 8ng</b>	<b>2.21</b>	<b>1.79</b>	<b>1.19</b>
<b>Nebennierendrüse 1.6ng</b>	<b>6.00</b>	<b>4.17</b>	<b>1.93</b>
<b>Mittelwert</b>	<b>3.08</b>	<b>2.38</b>	<b>1.51</b>
<b>Standardabweichung</b>	<b>2.5967</b>	<b>1.5799</b>	<b>0.3800</b>
<b>Variationskoeffizient</b>	<b>84.3%</b>	<b>66.4%</b>	<b>25.2%</b>
<b>Max.Fehler in %*</b> (Maximalwert/Mini- malwert -1) x 100	<b>483%</b>	<b>253%</b>	<b>62%</b>
<b>Hirn 40ng</b>	<b>1.61</b>	<b>2.14</b>	<b>2.92</b>
<b>Hirn 8ng</b>	<b>2.48</b>	<b>2.11</b>	<b>1.60</b>
<b>Hirn 1.6ng</b>	<b>6.68</b>	<b>4.66</b>	<b>2.54</b>
<b>Max.Fehler in %</b>	<b>315%</b>	<b>121%</b>	<b>82%</b>
<b>Mittelwert</b>	<b>3.59</b>	<b>2.97</b>	<b>2.35</b>
<b>Standardabweichung</b>	<b>2.7111</b>	<b>1.4637</b>	<b>0.6795</b>
<b>Variationskoeffizient</b>	<b>75.5%</b>	<b>49.3%</b>	<b>28.9%</b>
<b>Max.Fehler in %*</b> (Maximalwert/Mini- malwert -1) x 100	<b>75,5%</b>	<b>49,3%</b>	<b>28,9%</b>

[0125] Wie aus Tabelle 1 ersichtlich, besitzen die nach erfindungsgemäßer nicht-linearer Effizienzkorrektur ermittelten Werte bei beiden Proben-RNA's (Nebennierendrüse- und Hirn-Geweben) einen ca. dreifach geringeren Variationskoeffizienten als die jeweiligen Werte ohne Effizienzkorrektur und einen ca. zweifach geringeren Variationskoeffizienten als die jeweiligen Werte mit linearer Effizienzkorrektur. Auch der prozentuale maximale Fehler der bestimmten Kalibrator normierten Target/Referenz-Verhältnisse in Abhängigkeit von der Ausgangskonzentration wird durch die erfindungsgemäße nicht lineare Effizienzkorrektur bei beiden Target-RNA's signifikant verringert im Vergleich zur linearen Effizienzkorrektur bzw. im Vergleich zur Methode ohne Effizienzkorrektur. Diese Ergebnisse zeigen, dass die erfindungsgemäße Methode insbesondere bei Verfahren von Vorteil ist, bei denen eine Normalisierung mit Hilfe von Kalibratoren durchgeführt wird.

[0126] Kurzbeschreibung der Abbildungen:

**Abb. 1:**

Schematische Darstellung einer Funktion zur Bestimmung des Logarithmus einer relativen Konzentration in Abhängigkeit von der bestimmten Zykluszahl

**Abb. 2a:**

Bestimmung der Amplifikationseffizienz von CycA durch Ermittlung einer Regressionsgrade

**Abb. 2b:**

Bestimmung der Amplifikationseffizienz für PBGD durch Ermittlung einer Regressionsgrade

**Abb. 3a:**

Effizienzkorrektur für die Amplifikation von CycA mit Hilfe eines polynomischen Fits 4. Ordnung

**Abb. 3b:**

Effizienzkorrektur für die Amplifikation von PBGD mit Hilfe eines polynomischen Fits 4. Ordnung

## SEQUENZPROTOKOLL

<110> Roche Diagnostics GmbH

5 <120> Verfahren zur Bestimmung der Effizienz von  
Nukleinsäureamplifikationen

<130> 544300EP

10 <140> 544300EP  
<141> 2000-09-01

<160> 8

15 <170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1  
<211> 18  
<212> DNA  
20 <213> Homo sapiens

<400> 1  
ggccgcgtct cctttgag 18

25 <210> 2  
<211> 23  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

30 <400> 2  
cgagttgtcc acagtcagca atg 23

35 <210> 3  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

40 <400> 3  
ggccatggag cgctttgggt 20

<210> 4  
<211> 26  
45 <212> DNA  
<213> Homo sapiens

<400> 4  
50 aatggcaaga ccagcaagaa gatcac 26

<210> 5  
<211> 19  
<212> DNA  
55 <213> Homo sapiens

<400> 5  
cacacagcct actttccaa 19

60

65



<210> 6		
<211> 17		
<212> DNA		
<213> Homo sapiens		5
<400> 6		
ggtacccacg cgaatca	17	
<210> 7		10
<211> 22		
<212> DNA		
<213> Homo sapiens		
<400> 7		15
taacggcaat gcggctgcaa cg	22	
<210> 8		20
<211> 24		
<212> DNA		
<213> Homo sapiens		
<400> 8		25
cggaagaaaa cagcccaaag atga	24	

#### Patentansprüche

1. Verfahren zur Bestimmung der Effizienz der Amplifikation einer Target-Nukleinsäure, wobei
  - a) eine Verdünnungsreihe der Target-Nukleinsäure hergestellt wird
  - b) eine Amplifikation der Target-Nukleinsäure unter definierten Reaktionsbedingungen gemäß Anspruch 1 durchgeführt wird, wobei die Amplifikation der Nukleinsäure in Echtzeit gemessen wird
  - c) ein definierter Signalschwellenwert festgesetzt wird
  - d) für jede Verdünnung die Zykluszahl bestimmt wird, bei der der Signalschwellenwert überschritten wird
  - e) die Amplifikationseffizienz in Abhängigkeit von der ursprünglichen Menge an Target-Nukleinsäure bestimmt wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Effizienz der Amplifikation dadurch bestimmt wird, dass
  - a) eine Verdünnungsreihe der Target-Nukleinsäure hergestellt wird
  - b) eine Amplifikation der Target-Nukleinsäure unter definierten Reaktionsbedingungen gemäß Anspruch 1 durchgeführt wird, wobei die Amplifikation der Nukleinsäure in Echtzeit gemessen wird
  - c) ein definierter Signalschwellenwert festgesetzt wird
  - d) für jede Verdünnung die Zykluszahl bestimmt wird, bei der der Signalschwellenwert überschritten wird,
  - e) eine nicht lineare stetig differenzierbare Funktion eines Logarithmus der für die Amplifikation eingesetzten Kopienzahl an Target Nukleinsäure in Abhängigkeit von der Zykluszahl, bei der Signalschwellenwert überschritten wird, erstellt wird, und
  - f) aus der in e) ermittelten Funktion die Amplifikationseffizienz E berechnet wird.
3. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Effizienz der Amplifikation dadurch bestimmt wird, dass
  - a) eine Verdünnungsreihe der Target-Nukleinsäure hergestellt wird
  - b) eine Amplifikation der Target-Nukleinsäure unter definierten Reaktionsbedingungen gemäß Anspruch 1 durchgeführt wird, wobei die Amplifikation der Nukleinsäure in Echtzeit gemessen wird
  - c) ein definierter Signalschwellenwert festgesetzt wird
  - d) für jede Verdünnung die Zykluszahl bestimmt wird, bei der der Signalschwellenwert überschritten wird,
  - e) eine nicht lineare stetig differenzierbare Funktion der in Schritt d) ermittelten Zykluszahl in Abhängigkeit von einem Logarithmus der für die Amplifikation eingesetzten Kopienzahl an Target Nukleinsäure, erstellt wird, und
  - f) aus der in e) ermittelten Funktion die Amplifikationseffizienz E berechnet wird
4. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass die Amplifikationseffizienz E einer bestimmten ursprünglichen Menge an Target-Nukleinsäure als die negative lokale 1. Ableitung der stetig differenzierbaren Funktion aus Schritt e) ermittelt wird.
5. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Amplifikationseffizienz E einer bestimmten ursprünglichen Menge an Target-Nukleinsäure als die reziproke negative lokale 1. Ableitung der stetig differenzierbaren Funktion aus Schritt e) ermittelt wird.
6. Verfahren nach Anspruch 2-5, dadurch gekennzeichnet, dass die nichtlineare stetig differenzierbare Funktion aus Schritt e) mithilfe eines polynomischen Fits vorzugsweise 3., 4., 5., 6., oder 7. Ordnung ermittelt wird.
7. Verfahren zur absoluten Quantifizierung einer Target-Nukleinsäure in einer Probe, umfassend die folgenden Schritte:



- a) Bestimmung der Amplifikationseffizienzen der Target-Nukleinsäure sowie eines internen oder externen Standards unter definierten Amplifikationsbedingungen gemäß Anspruch 1–6
- b) Amplifikation der in der Probe enthaltenen Target-Nukleinsäure sowie des internen oder externen Standards unter den gleichen definierten Reaktionsbedingungen
- 5 c) Messung der Amplifikation von Target-Nukleinsäure und Standard in Echtzeit
- d) Berechnung der ursprünglichen Kopienzahl in der Probe durch Korrektur der aus Schritt c) abgeleiteten Kopienzahl mit Hilfe der in Schritt a) bestimmten Amplifikationseffizienzen
8. Verfahren zur Quantifizierung einer Target-Nukleinsäure in einer Probe relativ zu einer Referenz-Nukleinsäure, umfassend die folgenden Schritte:
  - 10 a) Bestimmung der Amplifikationseffizienzen der Target-Nukleinsäure und der Referenz-Nukleinsäure unter definierten Amplifikationsbedingungen gemäß Anspruch 1–6
  - b) Amplifikation sowohl der in der Probe enthaltenen Target-Nukleinsäure als auch der in der Probe enthaltenen Referenz-Nukleinsäure unter den gleichen definierten Amplifikationsbedingungen
  - c) Messung der Amplifikation der Target-Nukleinsäure und der Referenz-Nukleinsäure in Echtzeit
  - 15 d) Berechnung des ursprünglichen Verhältnisses von Target-Nukleinsäure und Referenz-Nukleinsäure in der Probe durch Korrektur des aus Schritt c) abgeleiteten Verhältnisses mit Hilfe der in Schritt a) bestimmten Amplifikationseffizienzen
9. Verfahren zur relativen Quantifizierung einer Target-Nukleinsäure im Verhältnis zu einer Referenznukleinsäure und normiert auf eine Kalibratorprobe, umfassend die folgenden Schritte:
  - 20 a) Herstellung einer gemeinsamen oder zwei getrennter Verdünnungsreihen von Target-Nukleinsäure und Referenz-Nukleinsäure
  - b) Amplifikation der verschiedenen Verdünnungen von Target-Nukleinsäure und Referenz-Nukleinsäure unter definierten Reaktionsbedingungen, wobei die Amplifikation der Nukleinsäure in Echtzeit gemessen wird
  - c) Festsetzung von definierten Schwellenwerten für Target-Nukleinsäure und Referenz-Nukleinsäure
  - 25 d) Bestimmung der Zykluszahlen  $C_p$ , bei denen die für Target-Nukleinsäure und Referenz-Nukleinsäure definierten Schwellenwerte in jeder Verdünnung überschritten werden
  - e) Erstellung einer stetig differenzierbaren Funktion der in d) bestimmten  $C_p$ -Werte in Abhängigkeit von einem Logarithmus der eingesetzten Mengen an Target-Nukleinsäure sowie Erstellung einer stetig differenzierbaren Funktion der bestimmten  $C_p$ -Werte in Abhängigkeit von einem Logarithmus der eingesetzten Mengen an Referenz-Nukleinsäure
  - 30 f) Bestimmung der  $C_p$ -Werte für Target-Nukleinsäure und Referenz-Nukleinsäure sowohl in der zu analysierenden Probe als auch in einer Kalibratorprobe
  - g) Zuordnung der in Schritt f) gemessenen  $C_p$ -Werte zu bestimmten Funktionswerten der in Schritt e) ermittelten Funktionen
  - 35 h) Bildung der Quotienten der Funktionswerte aus g) von Target-Nukleinsäure und Referenz-Nukleinsäure sowohl für die zu analysierende Probe als auch für die Kalibratorprobe
  - i) Bestimmung des Verhältnisses der beiden Quotienten aus h) als Maß für die ursprünglich in der Probe enthaltene Menge an Target-Nukleinsäure.
- 40 10. Verfahren zur relativen Quantifizierung einer Target-Nukleinsäure im Verhältnis zu einer Referenznukleinsäure und normiert auf eine Kalibratorprobe, umfassend die folgenden Schritte:
  - a) Herstellung einer gemeinsamen oder zwei getrennter Verdünnungsreihen von Target-Nukleinsäure und Referenz-Nukleinsäure
  - b) Amplifikation der verschiedenen Verdünnungen von Target-Nukleinsäure und Referenz-Nukleinsäure unter definierten Reaktionsbedingungen, wobei die Amplifikation der Nukleinsäure in Echtzeit gemessen wird
  - 45 c) Festsetzung von definierten Schwellenwerten für Target-Nukleinsäure und Referenz-Nukleinsäure
  - d) Bestimmung der Zykluszahlen  $C_p$ , bei denen die für Target-Nukleinsäure und Referenz-Nukleinsäure definierten Schwellenwerte in jeder Verdünnung überschritten werden
  - e) Erstellung einer stetig differenzierbaren Funktion des Logarithmus der eingesetzten Mengen an Target-Nukleinsäure in Abhängigkeit von den in d) bestimmten  $C_p$ -Werten sowie Erstellung einer stetig differenzierbaren Funktion eines Logarithmus der eingesetzten Mengen an Referenz-Nukleinsäure in Abhängigkeit von den bestimmten  $C_p$ -Werten
  - 50 f) Bestimmung der  $C_p$ -Werte für Target-Nukleinsäure und Referenz-Nukleinsäure sowohl in der zu analysierenden Probe als auch in einer Kalibratorprobe
  - g) Zuordnung der in Schritt f) gemessenen  $C_p$ -Werte zu bestimmten Funktionswerten der in Schritt e) ermittelten Funktionen
  - 55 h) Bildung der Quotienten der Funktionswerte aus g) von Target-Nukleinsäure und Referenz-Nukleinsäure sowohl für die zu analysierende Probe als auch für die Kalibratorprobe
  - i) Bestimmung des Verhältnisses der beiden Quotienten aus h) als Maß für die ursprünglich in der Probe enthaltene Menge an Target-Nukleinsäure.
- 60 11. Verfahren nach Anspruch 9–10, dadurch gekennzeichnet, dass die stetig differenzierbaren Funktionen aus Schritt e) mithilfe eines polynomischen Fits vorzugsweise 3., 4., 5., 6., oder 7. Ordnung ermittelt werden.
12. Verfahren nach Anspruch 1–11, dadurch gekennzeichnet, dass die Detektion der amplifizierten Nukleinsäuren mit Hilfe von mindestens einer Fluoreszenz-markierten Hybridisationssonde erfolgt
13. Verfahren nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, dass die Detektion der amplifizierten Nukleinsäuren mit Hilfe von FRET-Hybridisationsproben, Molecular Beacons oder TaqMan Sonden erfolgt
- 65 14. Verfahren nach Anspruch 1–11, dadurch gekennzeichnet, dass die Detektion der amplifizierten Nukleinsäuren



mit Hilfe eines DNA- bindenden Farbstoffs, vorzugsweise mit SybrGreen I erfolgt

Hierzu 3 Seite(n) Zeichnungen

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

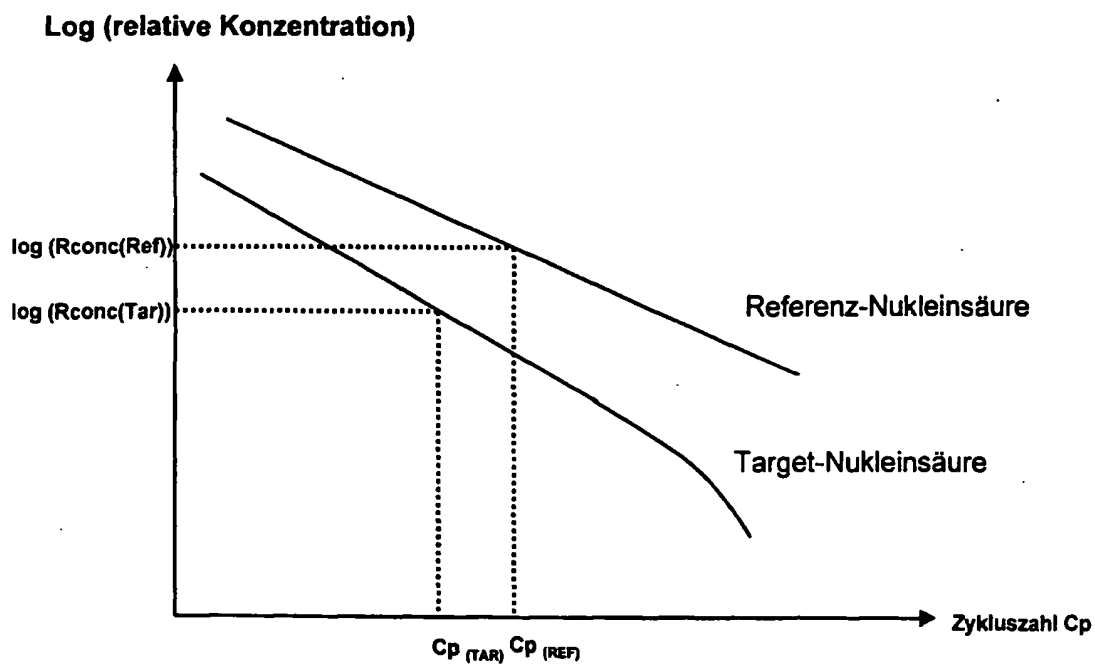


Fig. 1

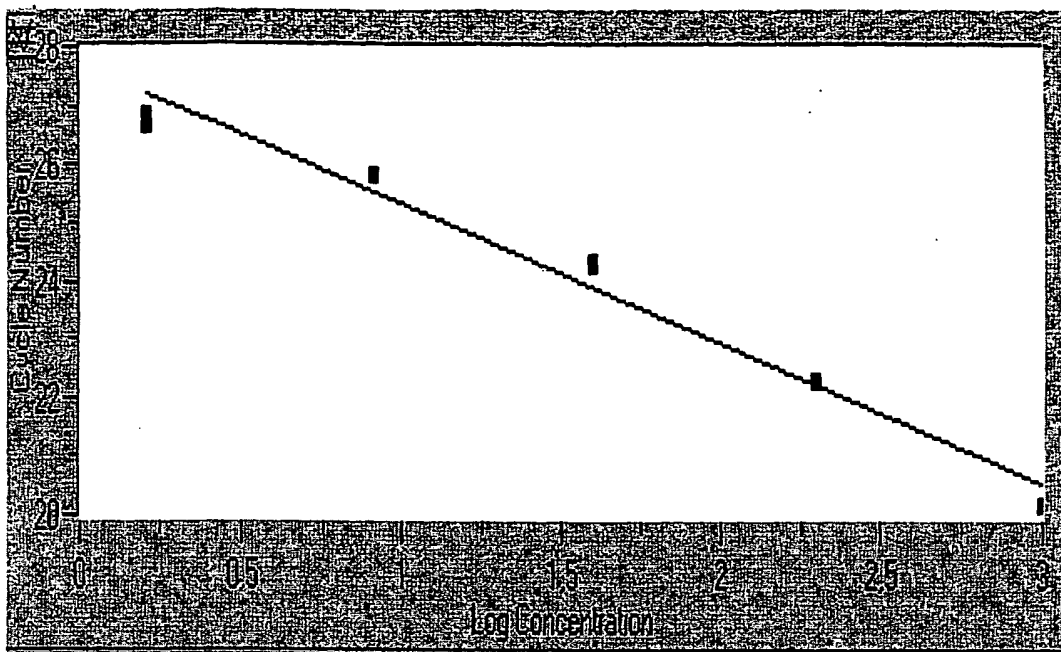


Fig. 2a

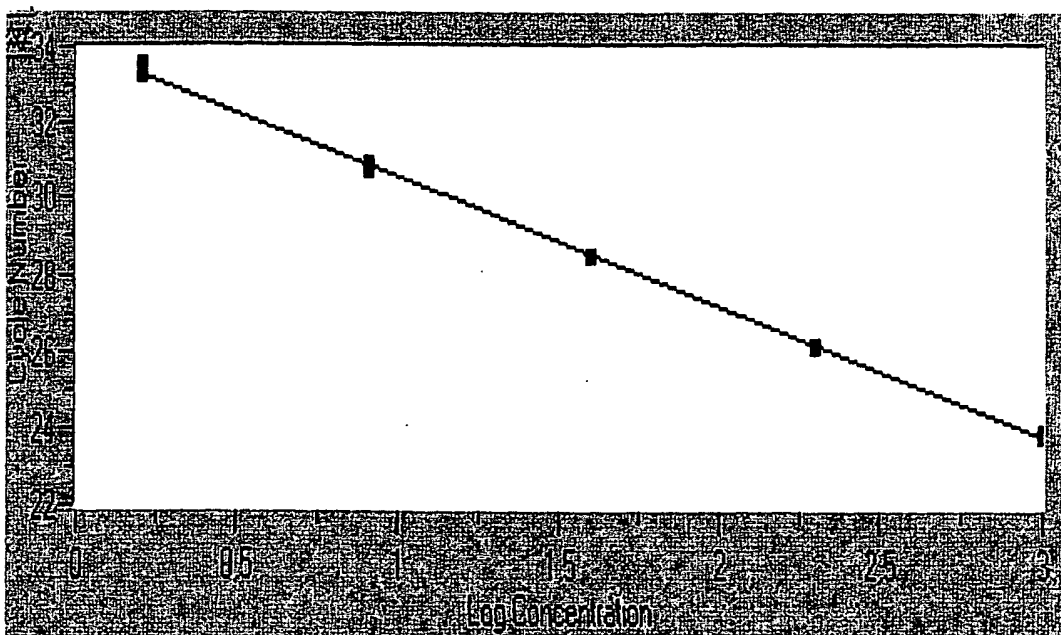


Fig 2b

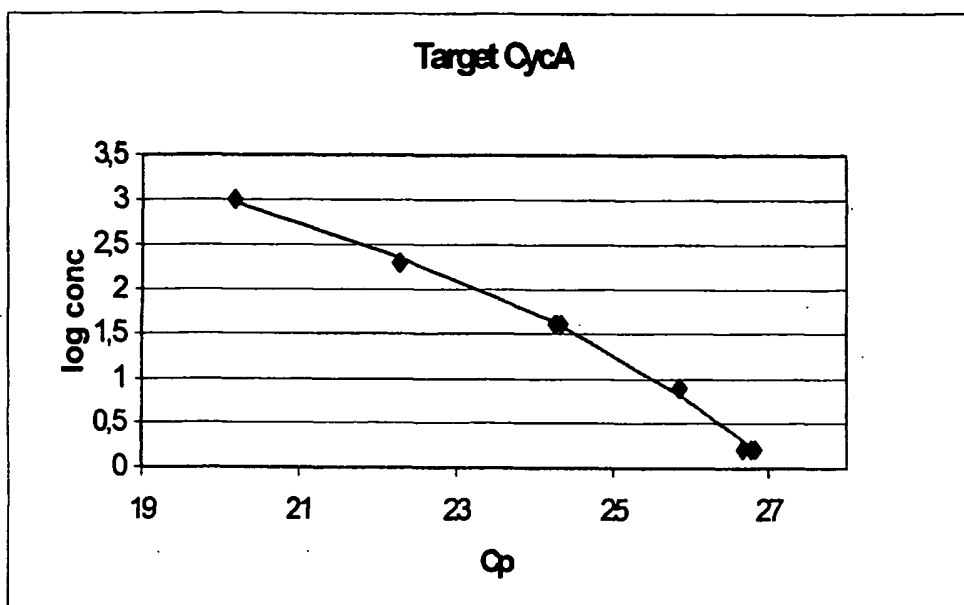


Fig. 3a

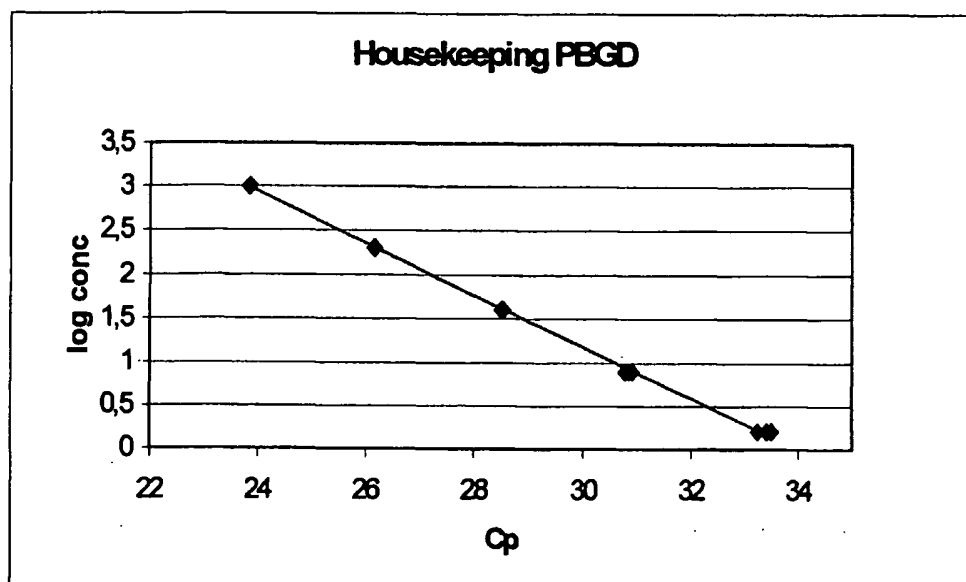


Fig. 3b